



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA DE QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA

DISEÑO *IN SILICO*, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN, *IN VIVO* DE
ANÁLOGOS DE *N-PANTOILGABA* DERIVADOS DE
PANTOLACTONA COMO POSIBLES AGENTES
ANTICONVULSIVANTES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO
LICENCIADO EN
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA

QUE PRESENTA :

GARDUÑO HERNÁNDEZ JOSÉ LUIS

DIRECTOR: DR. ADELFO NATALIO REYES RAMÍREZ

ASESOR: DR. OSVALDO GARRIDO ACOSTA

ASESOR EXTERNO: DR. JOSÉ ARTURO ALTAMIRANO ESPINO



CIUDAD DE MÉXICO

MAYO 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Un perpetuo agradecimiento a mis padres que, durante toda la trayectoria recorrida en este proyecto y en mi vida académica, jamás me han abandonado y que sin su cobijo que siempre me han dado y, estoy seguro, siempre me darán, no podría haber hecho todo lo que, hasta hoy, se esté leyendo este texto, he hecho.

Agradezco el apoyo dado por mis hermanos, cuya trayectoria académica, moral y de vida la he compartido con ellos, habiendo experiencias, risas y enojos, pero siempre tratando de ser los mejores.

Agradezco el apoyo dado por Alicia, ella es un pilar en este proyecto, aguantando mis altibajos en todo momento, jamás abandonándome.

Agradezco a todos mis amigos del laboratorio, cuyo apoyo e intercambio de pensamiento crítico, han sido de gran ayuda perpetua, para crecer como científicos.

Agradezco a todos mis amigos y compañeros de clases en la licenciatura de Médico Cirujano y Partero, que me apoyaron con los altibajos escolares surgidos por el limitado tiempo para realizar este proyecto.

Agradezco la técnica y conocimiento científico obsequiado por todos mis asesores. Considero que el mejor resultado obtenido de esta investigación es el criterio científico que me han dejado para siempre.

Agradezco profundamente al Dr. José Guadalupe Trujillo Ferrara por su apoyo y sus grandes enseñanzas epigenéticas, científicas y morales, las cuales me han dejado claro, que el conocimiento tiene un crecimiento de tipo evolutivo, ¿Lamarckiano o Darwiniano?



Agradezco profundamente a la ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA del INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL por haberme permitido desarrollar este proyecto durante mi estancia académica en Medicina.

Abreviaturas, acrónimos y símbolos

AMPA: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid

BHE: barrera hematoencefálica

BZD: benzodiacepinas

C.N.: Control negativo

CPCM: conductor-like polarizable continuum model

GABA-AT: GABA-aminotransferasa

GABA: gamma amino butyric acid

GAD: glutamic acid decarboxylase

GAT: GABA transporter

ILEA: International League Against Epilepsy

DL₅₀: dosis letal 50

NMDA: *N*-methyl *D*-aspartate

ns: Nanosegundos

PDB: Protein Data Bank

PG: *N*-pantoilGABA

PLP: Pyridoxal 5'-phosphate

PMP: Pyridoxamine 5'-phosphate

PTZ: Pentilentetrazol

PV: *N*-pantoilVigabatrina

QSAR: Quantitative structure–activity relationship

RMN: Resonancia magnética nuclear

RMSD: Root mean square deviation

SNC: Sistema nervioso central

SSADH: Succinic semialdehyde dehydrogenase

VAS: Valproate sodium

VGB: (*R*, *S*) Vigabatrina

ΔG : Energía libre de Gibbs

Δ : Calor

Tabla de contenido

1	Resumen.....	1
2	Introducción.....	3
3	Marco teórico.....	5
3.1	Epilepsia.....	5
3.2	Fármacos antiepilépticos y mecanismo de acción.....	6
3.3	Sistema GABAérgico.....	8
3.4	GABA-aminotransferasa (GABA-AT).....	11
3.5	Estructura y función de receptor de GABA_A.....	14
3.6	Diseño de fármacos asistido por computadora (DiFAC).....	16
3.6.1	Acoplamiento molecular.....	17
4	Antecedentes.....	20
4.1	N-pantoilGABA.....	26
5	Planteamiento del problema.....	28
6	Justificación.....	28
7	Hipótesis.....	28
8	Objetivos.....	28
8.1	Objetivo general.....	28
8.1.1	Objetivos particulares.....	29
9	Metodología.....	29
9.1	Ensayos <i>in silico</i>.....	29
9.1.1	Evaluación de propiedades fisicoquímicas ADME-Tox <i>in silico</i>	30
9.1.2	Generación y validación de modelos 3D de la GABA-AT.....	31
9.1.3	Optimización de los análogos de GABA.....	32
9.1.4	Preparación del <i>Docking</i> sobre los receptores GABA-AT.....	32
9.1.5	Reconocimiento molecular.....	33
9.1.6	Ensayos <i>in silico</i> del receptor GABA _A	34
9.2	Síntesis y caracterización de los análogos de GABA.....	34
9.3	Ensayos biológicos <i>in vivo</i>.....	34
10	Resultados y discusión.....	36
10.1	Validación de propiedades fisicoquímicas y ADME-Tox <i>in silico</i>.....	36
10.2	Generación de los modelos.....	37
10.3	Resultados de <i>Docking</i>.....	38
10.3.1	<i>Docking</i> sobre el cristal de PDB:ID 1OHV.....	38

10.3.2	<i>Docking</i> sobre isoforma modelada de <i>Homo sapiens</i>	44
10.3.3	<i>Docking</i> sobre isoforma de <i>Pseudomonas fluorescens</i> modelada.....	49
10.4	Dinámica molecular y <i>docking</i> del receptor GABA_A $\alpha_1\beta_2\gamma_2$	50
10.4.1	<i>Docking</i> a tiempo 0 (T_0).....	54
10.4.2	<i>Docking</i> a tiempo 60 ns.....	55
10.4.3	<i>Docking</i> a tiempo 120 ns.....	57
10.5	Análisis de resultados de las simulaciones moleculares	58
11	Síntesis y caracterización de pantoil-derivados	59
11.1	Síntesis y caracterización de <i>N</i> -pantoilVigabatrina	59
11.2	Síntesis y caracterización de <i>N</i> -pantoilGABA	62
12	Evaluaciones <i>in vivo</i>	64
12.1	Determinación de la DL_{50}	64
12.1.1	Toxicidad de la mezcla de <i>N</i> -pantoilVigabatrina.....	65
12.1.2	Toxicidad de la mezcla de <i>N</i> -pantoilGABA	67
12.2	Determinación de la actividad anticonvulsivante de los ligandos propuestos	68
12.2.1	Determinación de la actividad anticonvulsivante de la mezcla racémica de <i>N</i> -pantoilGABA	69
12.2.2	Determinación de la actividad anticonvulsivante de la mezcla de diastereoisómeros de <i>N</i> -pantoilVigabatrina	71
13	Conclusiones	73
14	Anexos	75
14.1	Preparación de columna Amberlite-IR-120	75
14.2	Extracción de vigabatrina a partir de tabletas SABRIL®.....	76
15	Referencias bibliográficas	77

1 Resumen

La epilepsia comprende un amplio grupo de desórdenes y enfermedades con diversas etiologías, así como diversas presentaciones eléctricas y una marcada variabilidad en la manifestación clínica. La ILAE define tres niveles diagnósticos en la epilepsia: convulsión tipo, epilepsia y síndrome epiléptico.

GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio del SNC en mamíferos. Uno de los blancos farmacológicos que se encuentra bajo la lupa en el diseño de fármacos anticonvulsivantes, es la modulación del sistema GABAérgico.

La vigabatrina es un fármaco ampliamente utilizado en la clínica para el manejo de la epilepsia. Su mecanismo de acción es inactivar la GABA-AT de forma irreversible esta componente del sistema GABAérgico. El ácido valproico es otro fármaco ampliamente utilizado, sin embargo, se sabe poco de su mecanismo de acción y se cree que tiene relación con el sistema GABAérgico de una forma aún inespecífica. Sin embargo, la necesidad de administrar dosis elevadas en el tratamiento crónico en adición a los efectos secundarios de este y otros fármacos con acción anticonvulsivante, apoya la búsqueda de nuevos moduladores de este sistema, donde exista una mejora en parámetros como la potencia, eficacia y efectividad, así como la disminución de la toxicidad asociada.

N-pantoilGABA es un medicamento aprobado para su venta en países como Rusia, poco conocido en occidente, que tiene un efecto depresor sobre el SNC debido a su interacción con los receptores GABA_A y se utiliza en combinación con otros fármacos para el tratamiento de la epilepsia.

En el presente trabajo se realizó el diseño de análogos de *N*-pantoilGABA que contienen como núcleo estructural la porción acíclica producto de la apertura del anillo de la pantolactona y la porción análoga al neurotransmisor GABA en forma de amidas. Los ensayos *in silico* realizados sobre la isoforma $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ del receptor GABA_A de humano fueron las simulaciones de dinámica molecular y *docking*, mientras que para las enzimas GABA-AT solo se realizó el *docking* de los ligandos. Se llevó a cabo la síntesis del mejor candidato de acuerdo a los atributos encontrados y del propio *N*-pantoilGABA, utilizando para su caracterización la

espectroscopía de RMN (Resonancia Magnética Nuclear) de ^1H y ^{13}C ; con estos productos obtenidos y purificados se realizaron los ensayos *in vivo* con ratones macho de la cepa CD-1, incluyendo un ensayo para determinar la **DL₅₀** y posteriormente se utilizó el modelo de inducción de crisis convulsivas con PTZ con la misma cepa para determinar actividad anticonvulsiva, tomándose como controles positivos la vigabatrina y el valproato sódico. Tomando en cuenta los diferentes tiempos de distribución plasmática del mejor candidato, se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la protección de las crisis convulsivas inducidas por PTZ entre el mejor candidato y el control negativo, no siendo así para los controles positivos y el propio *N*-pantoilGABA, obteniendo diferencia estadísticamente significativa con respecto a controles en la prueba de convulsiones químicamente inducidas por PTZ.

2 Introducción

La epilepsia es un trastorno que comprende un gran grupo de desórdenes y enfermedades con diversas etiologías. La ILAE define tres niveles diagnósticos en la epilepsia: convulsión tipo, epilepsia y síndrome epiléptico.¹

Los canales iónicos en el sistema nervioso son uno de los blancos seleccionados en la farmacoterapia de la epilepsia, que incluyen canales dependientes del voltaje que permiten el paso de iones de sodio, calcio, cloruro y potasio. Además, un importante blanco terapéutico, es la proteína SV2A (Synaptic vesicle protein 2 isoform A), localizada en vesículas presinápticas y encargada del almacenamiento, transporte y exocitosis del neurotransmisor al botón sináptico. Otros blancos terapéuticos importantes son las enzimas y receptores involucrados en los sistemas glutamatérgico y GABAérgico, que son los neurotransmisores excitatorio e inhibitorio más abundantes a nivel del SNC. Sin embargo, los fármacos utilizados en la práctica clínica para el control de la epilepsia, solo son eficaces en cerca de un tercio de los pacientes.² Además, los efectos adversos como somnolencia, embotamiento mental, ataxia, hepatotoxicidad, anemia megaloblástica, entre otros, complican el tratamiento que es crónico. Por esta razón, es necesario situarnos en el desarrollo de nuevos fármacos antiepilépticos con actividad a nivel de más de un receptor involucrado en los procesos de neurotransmisión, disminuyendo los efectos adversos, su toxicidad y ampliando las opciones terapéuticas.

El ácido γ -aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio del SNC en mamíferos. Algunos síndromes neurológicos como la epilepsia están relacionados a algún desequilibrio en la transmisión GABAérgica, disminuyendo así la respuesta inhibitoria a la actividad eléctrica del sistema nervioso. Sin embargo, GABA no cruza barrera hematoencefálica, razón por la cual no es práctico su uso en la práctica clínica.

Uno de los enfoques que se encuentra bajo la lupa en el diseño de fármacos antiepilépticos es la modulación del sistema GABAérgico mediante la interacción farmacodinámica entre nuevas moléculas con receptores y/o enzimas involucradas. La búsqueda de moléculas que inhiban la enzima GABA-aminotransferasa (GABA-

AT), y/o que interactúen con los diferentes tipos de receptores de GABA, es uno de los objetivos en el diseño de nuevos fármacos antiepilépticos.

El dímero de calcio de *N*-pantoilGABA es un fármaco aprobado en la Federación Rusa el cual se utiliza para diferentes condiciones como epilepsia con desaceleración de los procesos psíquicos y disminución de la productividad cognitiva (en combinación con otros fármacos anticonvulsivos), problemas cognitivos asociados a un daño cerebral, esquizofrenia con insuficiencia orgánica cerebral, epilepsia mioclónica, corea de Huntington y para menores con funcionamiento intelectual general inferior al normal. Su actividad se ha visto relacionada a la interacción indirecta con los sistemas colinérgico y dopaminérgico y con la interacción directa de los receptores GABA_A del sistema GABAérgico.

En el presente trabajo se realizó el diseño de análogos de *N*-pantoilGABA que tuvieran la propiedad de cruzar la barrera hematoencefálica (BHE) con el objetivo farmacológico de modular el sistema GABAérgico a través de la interacción con GABA-AT y receptores GABA_A, utilizando herramientas *in silico* como el software *Gaussian* para realizar la optimización de la conformación espacial mediante la minimización de la energía al mínimo global de los ligandos propuestos para posterior realizar el acoplamiento molecular mediante el software *Autodock vina*, así como el uso de la dinámica molecular con el software *GROMACS*, que en conjunto permitieron elegir los ligandos con mejor energía al reconocimiento molecular al sitio catalítico en el caso de las transaminasas, y sitio alostérico en el caso del receptor GABA_A para su posterior síntesis orgánica. La síntesis se realizó mediante la apertura del anillo de la mezcla racémica de pantolactona con aminoácidos análogos a GABA para la formación de un enlace de tipo amida. Posterior a la purificación y caracterización por RMN de ¹H y ¹³C, se realizaron las evaluaciones de **DL**₅₀ mediante el método de Lorke y por último los ligandos se pusieron a prueba en el modelo de crisis convulsivas inducidas con PTZ, este último con actividad antagonista del receptor GABA_A.

3 Marco teórico

3.1 Epilepsia

La epilepsia se define conceptualmente por la ILAE como un trastorno cerebral caracterizado por una predisposición continuada a la generación de crisis convulsivas. Una crisis epiléptica se define como “la aparición transitoria de signos y/o síntomas provocados por una actividad neuronal anómala excesiva o simultánea en el cerebro”.³ De acuerdo a la definición de la ILEA planteada en 2014⁴, la epilepsia es un desorden cerebral que se define por cualquiera de las siguientes circunstancias:

1. Al menos dos crisis no provocadas (o reflejas) con > 24 h de diferencia entre sus manifestaciones.
2. Una crisis no provocada (o refleja) y la probabilidad de presentar nueva crisis durante los 10 años siguientes, similar al riesgo general de recurrencia (al menos 60%) tras la aparición de dos crisis no provocadas.
3. Diagnóstico de un síndrome epiléptico.⁴

En todo el mundo, unos 70 millones de personas padecen epilepsia, lo que lo convierte en uno de los trastornos neurológicos más comunes. El riesgo de muerte prematura en las personas epilépticas es hasta tres veces mayor que en la población general, teniendo las tasas más altas en países de ingresos bajos y medianos, así como en las zonas rurales más que las urbanas. Además, se cree que anualmente se diagnostican unos 2.4 millones de casos de epilepsia, aunado a esto el diagnóstico no es siempre realizado o es infradiagnosticado en los países en vías de desarrollo, complicando el correcto tratamiento.⁵

Uno de los problemas en el tratamiento de la epilepsia es que alrededor de un tercio de los pacientes que son tratados con fármacos antiepilépticos de primera línea tienen convulsiones refractarias a la farmacoterapia. Una epilepsia se considera refractaria, resistente a los fármacos o intratable cuando las convulsiones no pueden ser controladas por al menos dos o tres fármacos para el tipo particular de epilepsia.⁶ El uso de alternativas terapéuticas como los canabidiolos como el CBD (canabidiol) en pacientes refractarios a la farmacoterapia convencional, ha llevado

a nuevas investigaciones de estas moléculas como posible alternativa terapéutica.^{7,8} La ILAE en el 2010 publicó un artículo donde proponía que la epilepsia farmacorresistente puede definirse como el fracaso de los ensayos adecuados a dos esquemas de fármacos antiepilépticos tolerados, elegidos y utilizados adecuadamente (ya sea en monoterapia o en combinación) para lograr la ausencia sostenida de crisis convulsivas. Este fenómeno se ve asociado a un incremento de la morbilidad y mortalidad, así como consecuencias psicosociales, problemas cognitivos reduciendo la calidad de vida.^{6,9} Asociado a esto último, se encuentran los efectos adversos que presentan estos fármacos por las altas dosis de los diferentes fármacos que llegan a recibir estos pacientes para tratar su condición, siendo una de las principales causas por las que existe una falla en el tratamiento farmacológico.¹⁰ Además, posterior a la farmacoterapia en el tratamiento de estos pacientes, las manifestaciones de epilepsia supra refractaria, llevan a optar por el tratamiento neuroquirúrgico, cuya relación con las crisis focales son muy limitadas. Este tipo de pacientes deben cumplir ciertos requisitos, además de ser supra refractarios a la farmacoterapia, para poder ser candidatos a neurocirugía como tratamiento de última instancia:^{11,12}

- Convulsiones resistentes a los medicamentos.
- Convulsiones que causan una discapacidad social y médica significativa.
- Reducir o detener las convulsiones daría como resultado una mejora significativa en la calidad de vida.
- La zona epileptogénica se puede localizar con datos convergentes de diferentes modalidades de investigación.
- Relación riesgo-beneficio aceptable para la cirugía.

3.2 Fármacos antiepilépticos y mecanismo de acción

Aunque la etiología de la epileptogénesis no es certera aún, los fármacos existentes en el mercado están diseñados para modificar la excitabilidad neuronal asociada a las crisis convulsivas. Existen fármacos que comprenden diferentes mecanismos de acción dependiendo de la diana terapéutica:¹³⁻¹⁶

1. Fármacos que actúan sobre los canales de Na^+ , modificando el tiempo de inactivación rápida o lenta de estos durante la despolarización de la membrana, impidiendo así el disparo en ráfagas de potenciales de acción y en consecuencia evitando convulsiones de tipo clónicas.
2. Fármacos que actúan sobre alguno de los componentes del sistema GABAérgico, aumentando así la acción inhibitoria del neurotransmisor GABA. Algunos actúan mejorando las respuestas de los canales de Cl^- activados por GABA, principalmente los receptores GABA_A en diferentes sitios del SNC, mejorando las condiciones clínicas de las crisis tónico-clónicas y ataques focales. Otros actúan como inhibidores de la enzima GABA-aminotransferasa (GABA-AT) manteniendo elevadas las concentraciones de GABA. Por otra parte, hay algunos que modulan a los transportadores de GABA como el transportador GAT-1 en el espacio sináptico inhibiendo la recaptación y manteniendo las concentraciones de este neurotransmisor en el espacio sináptico.
3. Bloqueadores de los canales de Ca^{2+} tipo T en el tálamo y neocorteza para tratar crisis convulsivas de tipo generalizadas, ya que se sabe que estos canales tienen un papel importante en las descargas de puntas-onda a 3Hz bilaterales.
4. Fármacos que actúan aumentando el tiempo de apertura de canales de K^+ , de esta forma permiten la salida masiva de este ion y con ellos permitiendo la repolarización de la membrana mucho más rápido.
5. Moduladores de la proteína SV2A en las vesículas presináptica implicadas en la liberación de neurotransmisores a la hendidura sináptica.
6. Otros mecanismos como, inhibidores de canales de Ca^{2+} de tipo L, antagonistas de los receptores glutamatérgicos sensibles al NMDA y al AMPA/Kainato.

Mecanismo de acción	Fármaco
Unión a canales de Na ⁺ aumentando el tiempo de inactivación tanto rápida como lenta	Carbamazepina, fenitoína, felbamato, valproato, lamotrigina, oxcarbazepina, elicarbazepina, topiramato, zonisamida, rufinamida, lacosamida
Moduladores del receptor GABA _A alostérico	Benzodiazepinas, fenobarbital, felbamato, primidona, topiramato, carbamazepina, oxcarbazepina, estiripentol, clobazam
Inhibidores de la absorción de GABA/ Inhibidores de GABA-T	Tiagabina, vigabatrina
Bloqueadores de canales de Ca ²⁺ de tipo T	Etosuximida, zonisamida
Unión de canales de K ⁺ aumentando el tiempo de apertura	Retigabina
Moduladores de la proteína SV2A en las vesículas presináptica	Levetiracetam
Fármacos con algún otro mecanismo de acción	Gabapentina, pregabalina, felbamato, ezogabina, fenobarbital, topiramato, perampanel, cannabidioles

Tabla 3-1 Fármacos antiepilépticos según su mecanismo de acción.

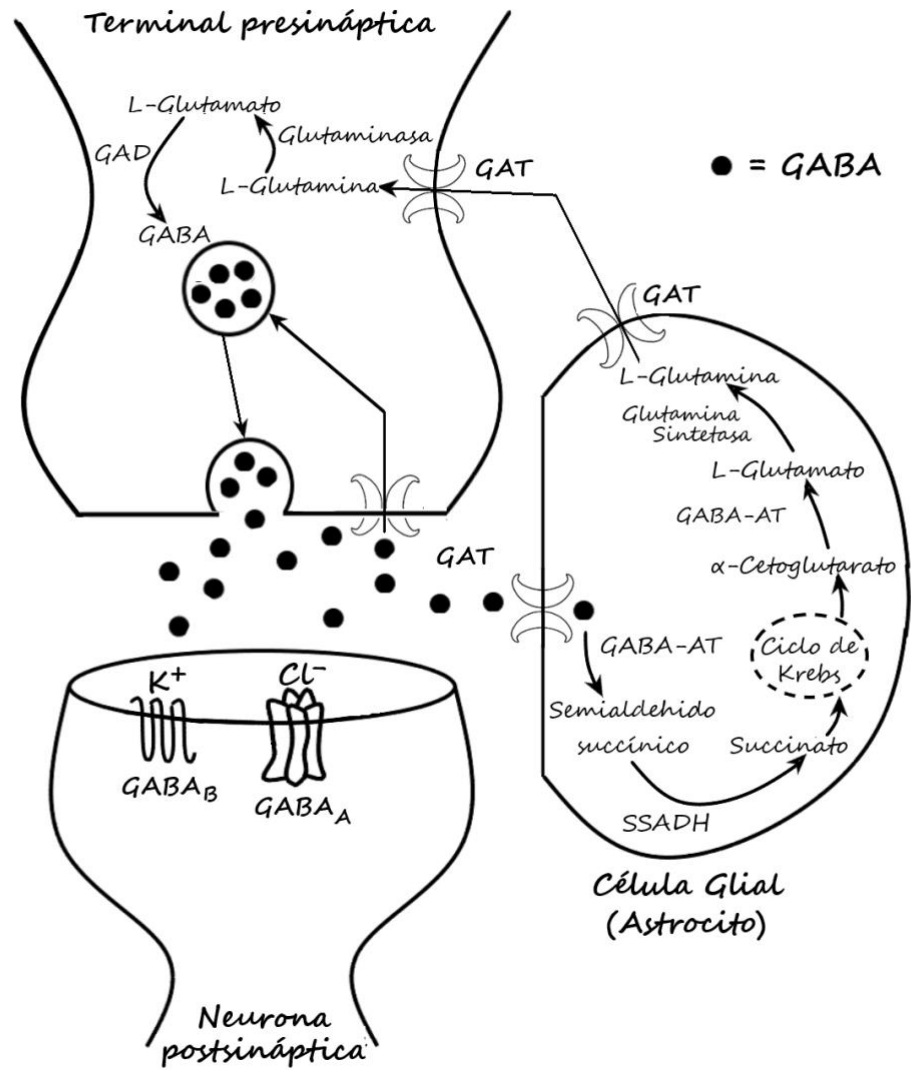
Algunos de estos fármacos actúan a nivel de distintos blancos, como se muestra en la Tabla 3-1, presentan más de un mecanismo de acción, por ejemplo, la carbamazepina actúa en los canales de Na⁺ pero también lo hace en los receptores GABA_A. Otro ejemplo es el fenobarbital, que actúa como modulador de los receptores de GABA_A y a su vez en como antagonista de los receptores glutamatérgicos sensibles al AMPA/Kainato.

3.3 Sistema GABAérgico

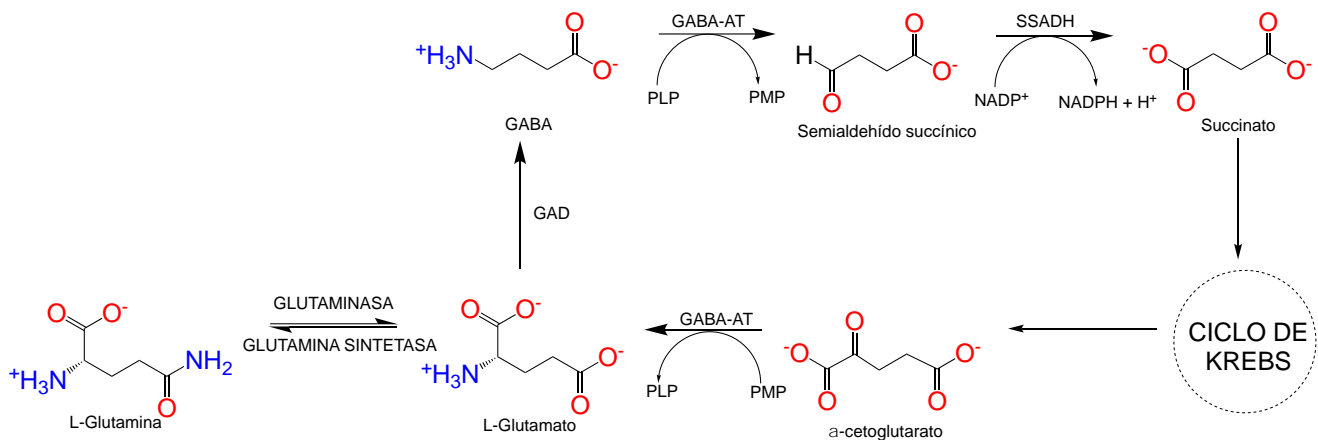
El sistema GABAérgico y los canales iónicos constituyen dos elementos esenciales en el funcionamiento del SNC por lo que una disminución significativa de su funcionamiento supone una pérdida de control del sistema, que tiene en las convulsiones su máxima expresión. Por el contrario, su hiperactividad lleva a una inhibición generalizada del funcionamiento del SNC que puede llegar hasta el coma.¹⁷

El sistema GABAérgico participa en el control del movimiento mediante las vías eferentes de los ganglios basales y en algunas proyecciones de largo alcance en la corteza cerebelosa, la sustancia negra, el *globus pallidus* y el núcleo reticular del tálamo.¹⁸ Los fármacos que estimulan la neurotransmisión GABAérgica presentan efectos hipnóticos, ansiolíticos, anestésicos, antiespásticos y anticonvulsivantes.¹⁷

En las neuronas GABAérgicas el *L*-glutamato es biotransformado a GABA por acción de la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD) (EC 4.1.1.15).^{17,18} El GABA sintetizado en el citoplasma puede ser almacenado en vesículas presinápticas mediante transportadores de GABA (GAT) alcanzando una concentración de 10 a 20 veces mayor que en el citoplasma.¹⁷ Posterior a la despolarización mediante la apertura de canales de Ca^{+2} , las vesículas se fusionan con la membrana presináptica y GABA es liberado al espacio sináptico, en donde se difunde y comienza a actuar sobre sus diferentes receptores.¹⁹ Después de la liberación de GABA en el espacio sináptico y la sinapsis, este es recapturado por transportadores GAT y es llevado a los astrocitos o a las neuronas presináptica para su reutilización en el ciclo. En la matriz mitocondrial de los astrocitos se encuentra la enzima GABA-aminotransferasa (GABA-AT, EC 2.6.1.19), la cual transforma GABA en semialdehído succínico, para ser oxidado por la semialdehído succínico deshidrogenasa (SSADH, EC1.3.5.1), con ayuda del βNADP^+ a succinato, el cual se incorpora al ciclo de Krebs. En este primer proceso, GABA-AT contiene como cofactor al piridoxal-5'-fosfato (PLP), que al degradar a GABA, es reducido a la forma de piridoxamina-5'-fosfato (PMP). Al tener como cofactor al PMP, esta enzima puede biotransformar el α -cetoglutarato, proveniente del ciclo de Krebs en *L*-glutamato y entonces así oxidar y regresar al cofactor a PLP. En las células gliales no se encuentra presente la GAD, por lo que el *L*-glutamato es convertido a *L*-glutamina por la glutamina sintetasa (EC 6.3.1.2), esta es transportada a las células presinápticas, y es transformada en estas de nuevo a *L*-glutamato por la GAD, para así comenzar el ciclo de nuevo. De esta manera se regulan los neurotransmisores inhibitorios y excitatorios más abundantes en el SNC. (Esquema 3-1) y (Esquema 3-2)^{2,20}



Esquema 3-1 Proceso de neurotransmisión del sistema GABAérgico. GAD (ácido glutámico descarboxilasa), GAT (transportador de GABA), SSADH (semialdehído succínico deshidrogenasa), GABA-AT (GABA aminotransferasa).



Esquema 3-2 Ruta metabólica acoplada a las enzimas GABA-AT, SSADH y GAD, mecanismo por el cual el funcionamiento de esta ruta regula la producción de los neurotransmisores más importantes antagonistas entre sí del SNC. Además, se puede observar la participación del ciclo de Krebs dentro de esta misma ruta en la que el producto α -cetoglutarato es convertido por la misma GABA-AT a L-Glutamato, que a su vez restablece el funcionamiento de la propia GABA-AT a través de la conversión del PMP a PLP, mecanismo llamado bi-bi pingpong. Se puede observar que se puede salir del ciclo mediante la transformación de L-Glutamato en L-Glutamina. PMP, piridoxamina 5' fosfato; PLP, piridoxal 5' fosfato; GABA-AT, GABA-aminotransferasa; SSADH, semialdehído succínico deshidrogenasa; NADP⁺ Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado; NADPH + H, Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido; GAD, ácido glutámico descarboxilasa. Tomado y modificado de **Richard B. Silverman Chemical Reviews 2018, 118 (7), 4037-4070**

3.4 GABA-aminotransferasa (GABA-AT)

Actualmente no se cuenta con la estructura cristalina de la GABA-AT humana, por lo que se utilizó el cristal ya reportado de *Sus scrofa* (PDB ID: 1OHV) para realizar el modelado del cristal humano a partir de su secuencia primaria de aminoácidos y la conformación de 1OHV. (Ilustración 3-1). Esta es una enzima homodimérica asignada con la clave EC² 2.6.1.19 que se encuentra en la mitocondria de los astrocitos en la cual cada monómero consta de 472 residuos de aminoácidos teniendo un peso molecular de 56 kD. La estructura de esta enzima se dedujo a partir de ADN complementario de encéfalo de cerdo y de fragmentos de péptidos de enzima de hígado del mismo animal, teniendo una secuencia del 96% de identidad con una 92% de cobertura y un 98% de homología con la isoforma humana.^{2,21}

Los dos monómeros se encuentran entrelazados por un grupo [2Fe-2S] *Iron-Sulfur cluster*, factor que se encuentra unido a motivos de cisteína mediante un enlace

covalente al azufre de dicho aminoácido y el hierro el cual se encuentra situado al fondo y centro de la proteína, uniendo así de esta manera los dos monómeros en una estructura cuaternaria.²¹ Esta enzima utiliza como coenzima al PLP en la biotransformación de GABA, y PMP para el caso de que el sustrato sea α -cetoglutarato.

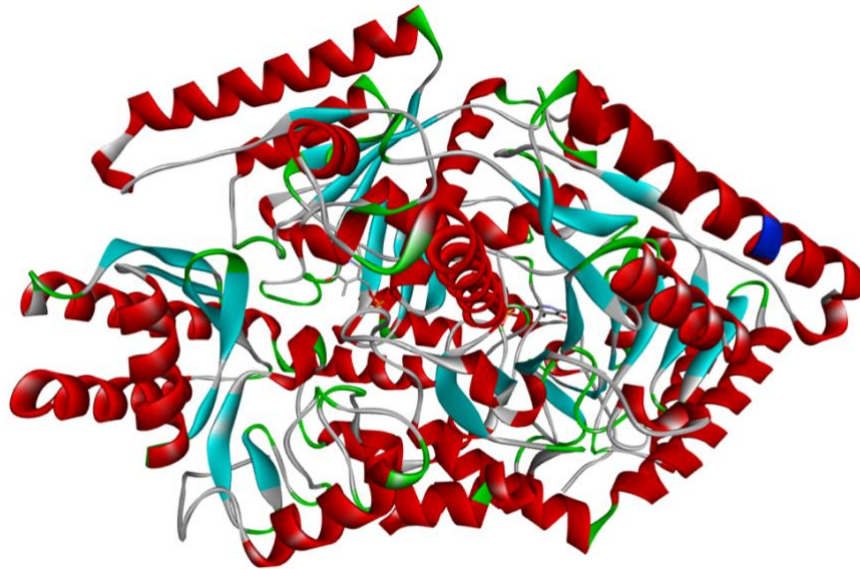


Ilustración 3-1 Enzima GABA-AT de *Sus scrofa* (PDB 1OHV) con PLP en el sitio activo como coenzima, al contar con dos dímeros unidos por el *iron sulfur cluster*, cuenta a su vez con dos sitios catalíticos, sin embargo, estos dos no trabajan al mismo tiempo, siendo que primero se ocupa uno de los sitios y posteriormente puede ser utilizado el otro, llamándose a este tipo de mecanismo *bibi-pingpong*.

La coenzima PLP se encuentra unida por medio de un enlace covalente ϵ -aminoácido al residuo Lys329, formando una base de Schiff (imina). Esta coenzima se encuentra estabilizada en el sitio activo por medio de varias interacciones no covalentes; el grupo fosfato se encuentra sujeto firmemente por medio de puentes de hidrógeno con los residuos de Ser137, Gly136, ambos del mismo dímero, y Thr353 del segundo dímero. Asp298 estabiliza el nitrógeno protonado de la porción de piridina, además este anillo interactúa en forma de sándwich mediante una interacción de tipo π — π entre Val300 y Phe189. Una última interacción es con Gln301 mediante un puente de hidrógeno entre este y el oxígeno de la posición 5 del anillo de la piridina, el cual se encuentra desprotonado.^{2,21} (Ilustración 3-2)

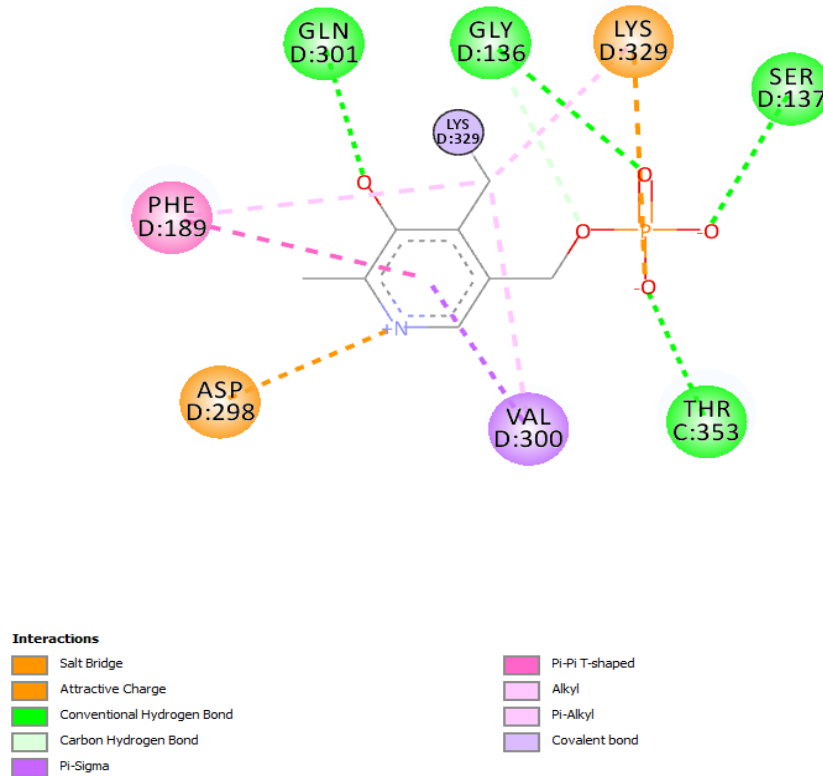
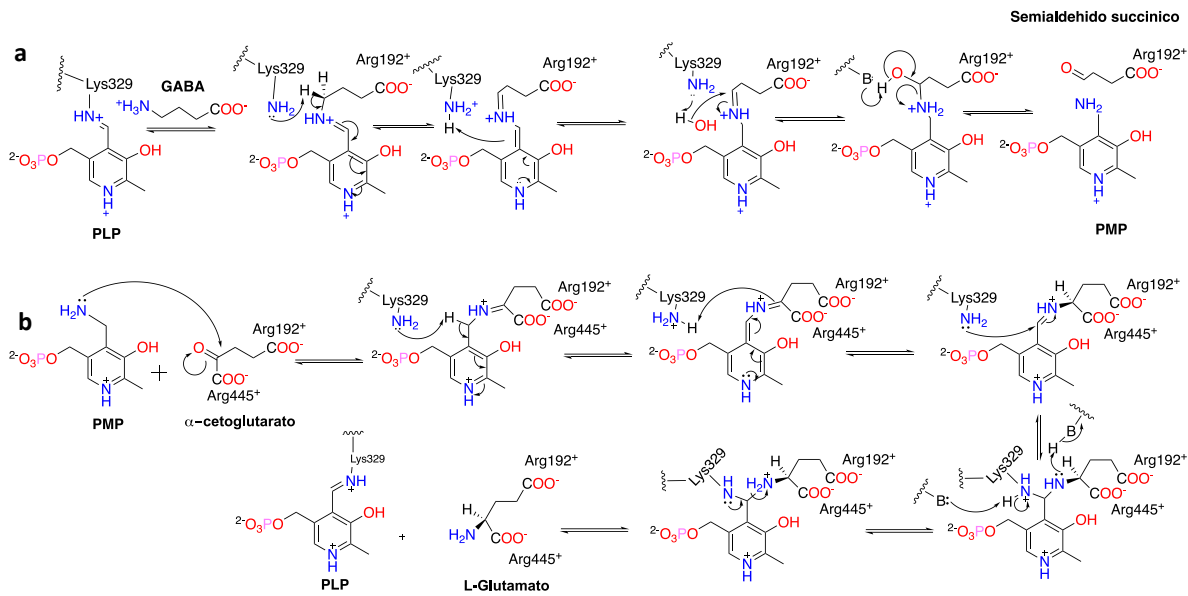


Ilustración 3-2. Representación 2D de las interacciones no covalentes que estabilizan al cofactor PLP en el sitio catalítico de *Sus scrofa* (PDB 1OHV). LYS329 se encuentra enlazado a PLP por medio de un enlace ϵ -aminoácido.

Cada dímero contiene una coenzima, por lo tanto, un sitio activo por monómero, sin embargo, estos no están activos al mismo tiempo, estando activo solo uno y posterior al acoplamiento y conversión del sustrato hay un cambio conformacional de la enzima siendo posible incorporar un nuevo sustrato en el siguiente sitio.^{2,20} Esta enzima, como se mencionó previamente, cuando se encuentra unida al PLP, el sustrato es GABA y este es convertido a semialdehído succínico. Durante este proceso, la coenzima PLP es convertida a PMP, haciendo que este sitio activo ya no sea para GABA y en cambio entre el α -cetoglutarato que es convertido en el neurotransmisor excitatorio *L*-glutamato, regresando así el PMP a su forma oxidada de PLP quedando el sitio activo listo para actuar sobre GABA, lo que quiere decir que trabaja mediante un mecanismo enzimático de tipo *Bi-Bi Ping Pong*. (Esquema 3-3)²²



Esquema 3-3 Mecanismo de reacción propuesto para la conversión de sustrato en producto y viceversa por acción de la GABA-AT. En **a)** se muestra la transaminación que desamina a GABA mediante una adición nucleofílica de intercambio entre el sustrato con la Lys329 unida al PLP, disminuyendo el pKa de los hidrógenos γ del GABA, permitiendo que sea sustraído, en específico el hidrogeno pro-S, por el grupo amino de la misma Lys329, condicionando el rearrreglo electrónico por deslocalización y estabilización del carbanión generado, formando una base de Schiff, la cual sufre un ataque nucleofílico por el oxígeno de una molécula de agua al doble enlace liberando al ahora semialdehído succínico y el PMP. En una segunda parte **(b)** sucede un proceso parecido con el ahora sustrato α -cetoglutarato el cual primero sufre la adición nucleofílica de la amina del PMP al carbono carbonilo α -ceto para formar una imina, que posteriormente mediante la desprotonación por parte de la lisina se estabiliza el anillo, para que, en un paso posterior al regresar la carga, se protona el glutarato para activarse y ser atacado el PMP por el grupo amino de la lisina. La estabilización de las cargas deja susceptible para un ataque nucleofílico de la amina de la Lis329 generada en el paso anterior, dando lugar al L-Glutamato como grupo saliente, generando así de nuevo el PLP. Se puede notar el papel de las Argininas al estabilizar las cargas de los oxígenos de los carbonos carbonilos de los ácidos carboxílicos del glutarato en todo momento, el cual es fundamental para mantener estabilizado el complejo para su reareglo electrónico y reacción enzimática.^{2,22,23}

3.5 Estructura y función de receptor de GABA_A

El receptor GABA_A, es un receptor heteromérico, formado por dos subunidades α , dos β y una γ , pertenece a la familia de los Cys-Loop Receptors y es el receptor más abundante para GABA en el SNC.²¹ Este receptor presenta 6 lazos en bucle (A-F) en forma de horquilla que interactúan con el disolvente para estabilizar y proteger el sitio ortostérico de la entrada de GABA. Se cree que estas horquillas cubren el sitio ortostérico de unión de GABA. Estas horquillas tienen una gran

flexibilidad y dependiendo del ligando, agonista o antagonista, se encuentran en estado cerrado o abierto, respectivamente.²⁴ En el caso de que estas se encuentren abiertas por cambios conformacionales debido a la unión alostérica de algún modulador GABAérgico, puede permitir la entrada del ligando ortostérico. Se cree que el movimiento de estas horquillas está relacionado con la apertura o cierre del receptor, permitiendo o impidiendo la entrada de aniones cloruro.^{24,25}

Actualmente se cuenta con la estructura cristalográfica del receptor GABA_A de humano, determinada por difracción de rayos-X o RMN, sin embargo, no ha sido la isoforma más abundante y algunas de estas estructuras transmembrana no han sido optimizadas para el reconocimiento molecular.²⁶⁻²⁸ Han habido aproximaciones a la estructura de este, modelados a partir de templetas con cierta similitud en la secuencia de aminoácidos y estructura tridimensional. En 2013, el Dr. Rikkie Bergmann y colaboradores reportaron el modelado del receptor GABA_A isoforma 2 α 2 β γ humano a partir de dos receptores de la misma familia con cierto grado de similitud estructural en diferentes segmentos de la secuencia de aminoácidos.²⁴ Los templetas utilizados fueron el canal de Cl⁻ activado por glutamato del nematodo *Caenorhabditis elegans* y del canal de iones procarionte de *Erwinia chrysanthemii*. Las interacciones de GABA con los aminoácidos del sitio activo se determinaron a partir de evidencia experimental de mutaciones puntuales, siendo que GABA forma puentes de sal con α R166 y β E155, puentes de hidrógeno con α T129, β T202, interacciones de GABA con β S156 y por último hay una interacción de tipo Pi-cación con β Y205. Además, en el sitio de unión de las benzodiazepinas, la interfaz entre las subunidades alfa y gamma se modeló en presencia del modulador alostérico diazepam (Ilustración 3-3).

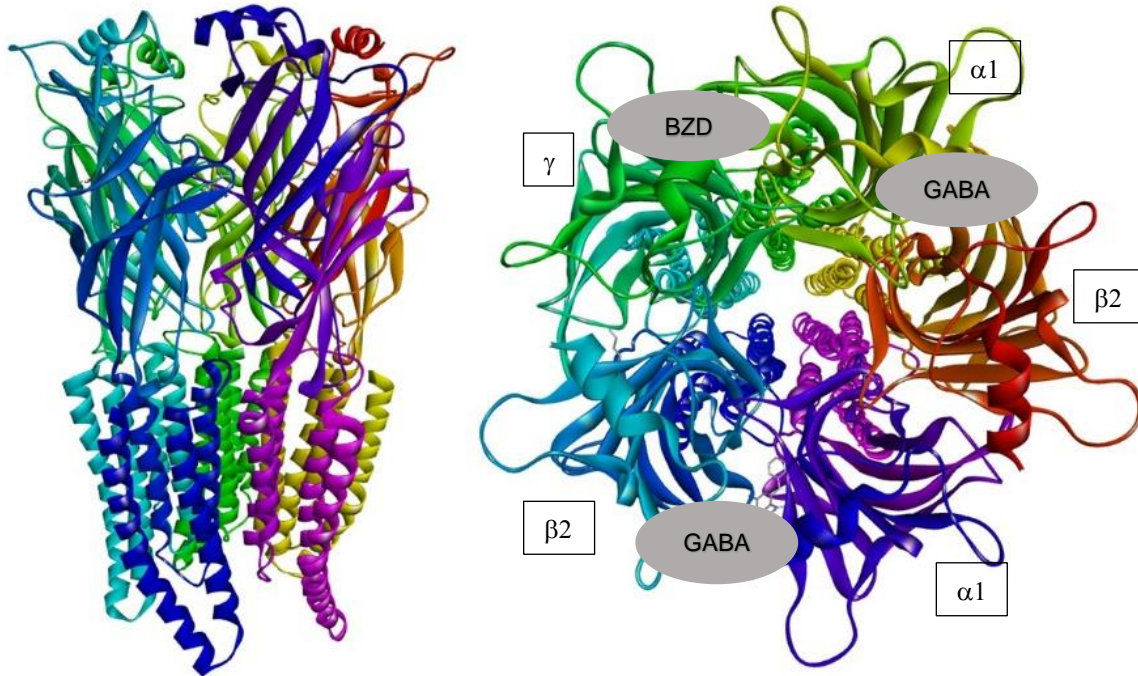


Ilustración 3-3 Receptor GABA_A isoforma 2α2βγ2 modelado a partir de especies filogenéticamente homologas, en la figura de la derecha se pueden observar las horquillas del sitio ortostérico. El sitio ortostérico de GABA se sitúa entre la subunidad α1 y β2 mientras que el sitio alosterico de benzodiazepinas se encuentre entre la subunidad γ2 y α1. Realizado mediante el acoplamiento de las secuencias de aminoácidos de varias isoformas con relación filogenética y modelado mediante softwares de modelado proteico y estabilizado mediante dinámica molecular. Bergmann y cols. 2013.²⁴

3.6 Diseño de fármacos asistido por computadora (DiFAC)

El diseño de fármacos dirigidos a una diana específica, es parte de las estrategias consideradas en la búsqueda de ligandos con la mayor afinidad posible a su blanco para obtener una respuesta terapéutica.²⁹

En los últimos años, el avance de las diferentes herramientas computacionales ha ido mejorando la probabilidad de encontrar moléculas con actividad terapéutica o los llamados *hit compounds*.³⁰ Además, las bases de datos que contienen información cristalográfica de las proteínas, así como las secuencias de ADN que codifican a estas son de gran ayuda y su número ha ido en aumento.²⁹

Una de las ventajas del DiFAC son los bajos costos, y el poco tiempo en el que se obtienen resultados para la búsqueda de ligandos con gran potencial farmacológico. Cabe resaltar que el tiempo depende de la capacidad de procesamiento de los

ordenadores que se utilicen para llevar a cabo los ensayos, ya que estos son cálculos con un gran requerimiento de procesamiento, relativamente, por lo que a mayor capacidad de procesamiento, disminuirá el tiempo y aumentará la probabilidad de encontrar candidatos para llevarlos a los ensayos *in vitro* e *in vivo*.²⁹ El desarrollo de diferentes fármacos actualmente comerciales, por ejemplo, saquinavir, ritonavir, indinavir y tirofiban han sido sustancialmente beneficiados del uso del diseño de fármacos asistido por computadora, utilizando herramientas como el *docking molecular*.³¹

El diseño basado en la estructura macromolecular de la diana terapéutica (*structure-based*) y el diseño basado en la estructura del ligando (*ligand-based*) son dos métodos en química computacional que ayudan en el diseño de nuevos fármacos.³² En el primero, herramientas como el acoplamiento molecular (*molecular docking*) y la dinámica molecular (*molecular dynamics*) sirven para predecir interacciones entre el ligando y la diana farmacológica, además de las energías de unión al reconocimiento entre estos y las conformaciones espaciales más estables entre los dos. En el diseño basado en la estructura del ligando se toma como referencia alguna molécula que tenga afinidad y actividad conocida por la diana en estudio, y se realiza la comparación de las propiedades fisicoquímicas mediante la correlación de la actividad biológica de este con los ligandos propuestos. Por su parte, los estudios de relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR, por sus siglas en inglés) funcionan tomando como base la estructura del ligando.^{30,31}

3.6.1 Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular (*molecular docking*) es una técnica cuyo objetivo es dar una predicción del complejo ligando-proteína en los métodos computacionales, arrojando resultados de las conformaciones e interacciones que existen entre estos en su estado de menor energía, en donde el receptor puede ser una proteína soluble, una enzima, un anticuerpo, una proteína de membrana etc.^{29,30}

Esta herramienta ha sido de gran utilidad en el diseño de fármacos, realizando técnicas como el llamado *virtual screening* filtrando ligandos virtuales con gran potencial farmacológico que, comparado con técnicas como los llamados

experimentos *high-throughput screening*, es de mucho menor costo económico y computacional (tiempo en el que se lleva a cabo).³⁰

Una de las desventajas del acoplamiento molecular es que, si la estructura tridimensional del receptor no se encuentra caracterizada por técnicas como RMN o difracción de rayos-X, este no se puede realizar. Afortunadamente, existen softwares que permiten el modelado de la estructura arquitectónica de alguna proteína o receptor con cierta precisión utilizando su secuencia de aminoácidos, tomando como templete otra proteína que se encuentre caracterizada y que tenga un elevado porcentaje de homología en su secuencia de ADN y por tal la expresión estructural y funcional.³³

El acoplamiento molecular se lleva a cabo en dos pasos: primero se hace un muestreo de las conformaciones que puede tomar el ligando en la proteína (*sampling algorithms*), después se realiza una evaluación de esas conformaciones mediante métodos matemáticos llamados *scoring functions*. Dos de los métodos de muestreo más utilizados son el llamado Algoritmo Monte Carlo y los algoritmos genéticos, como el Lamarckiano, algoritmo basado en poblaciones de descendientes de los cuales se escogen los mejores y se parte de esa nueva generación para la creación de la siguiente por lo que es un proceso iterativo. Estos dos se basan en búsqueda de las conformaciones más estables mediante métodos probabilísticos.³⁰

Los *scoring functions* se dividen en diferentes categorías dependiendo de lo que se tome en cuenta para la evaluación del complejo ligando-receptor. Con los llamados *semiempirical scoring functions* basados en campos de fuerza (*force-field-based*) en donde se estima la afinidad del ligando por la proteína mediante la suma de las fuerzas intermoleculares e intramoleculares posteriores a un cribado molecular sobre el receptor. Por ejemplo, Autodock 4.2.6,³⁴ uno de los tantos softwares utilizados en las simulaciones de *Docking*, utiliza un campo de fuerza semi-empírico para evaluar las conformaciones registradas durante el ensayo. Este campo de fuerza fue parametrizado a partir de un largo número de complejos ligando-proteína ya conocidos cuyas constantes de inhibición e interacciones también son conocidas. Este campo de fuerza incluye seis evaluaciones por pares (V), unión y repulsión del

ligando-ligando, proteína-proteína, proteína-ligando y una estimación de la entropía conformacional perdida al unirse (ΔS_{conf}).³⁴

$$\Delta G = (V_{bound}^{L-L} - V_{unbound}^{L-L}) + (V_{bound}^{P-P} - V_{unbound}^{P-P}) + (V_{bound}^{P-L} - V_{unbound}^{P-L} + \Delta S_{conf})$$

En donde ΔG es la energía libre del sistema ligando-receptor, L es el ligando y P la proteína respecto de la que se está modelando.

Cada uno de los términos energéticos por pares (V) incluye evaluaciones de dispersión, repulsión, puentes de hidrógeno, electrostática y desolvatación:

$$V = W_{waw} \sum_{i,j} \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} + W_{hbond} \sum_{i,j} E(t) \frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} + W_{elec} \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{e(r_{ij}) r_{ij}} + W_{sol} \sum_{i,j} (S_i V_j + S_j V_i) e^{\frac{-r_{ij}^2}{2\sigma^2}}$$

Donde las constantes W han sido optimizadas para calibrar la energía libre empírica basada en una serie de constantes de unión experimentalmente determinadas. El primer término es un típico potencial 6/12 (potencial de Lennard-Jones) para interacciones de dispersión/repulsión. El segundo término es un término direccional de enlace de hidrógeno basado en un potencial 10/12. Los parámetros C y D se asignan para dar una profundidad máxima en la curva de potencial de 5 Kcal/mol a 1.9 Å para enlaces de hidrógeno con oxígeno y nitrógeno, y una profundidad máxima en la curva de potencial de 1 Kcal/mol a 2.5 Å para enlaces de hidrógeno con azufre. La función E(t) proporciona la dirección basada en el ángulo t de la geometría ideal de los enlaces de hidrógeno. El tercer término es un potencial de Coulomb selectivo para electrostática. El último término (W_{sol}) es un potencial de desolvatación basado en el volumen de los átomos (V) que rodean un átomo dado y lo protegen del disolvente, ponderado por un parámetro de solvatación (S) y un término exponencial con factor de ponderación de distancia $\sigma = 3.5 \text{ \AA}$.³⁴

Por otro lado, *Autodock Vina*, es un software diseñado por los mismos creadores de *Autodock 4.2.6* con el objetivo de disminuir el tiempo de cálculo computacional teniendo la misma precisión en el resultado, y es un software que hace el cálculo de la energía de unión con base en la siguiente ecuación:³⁵

$$c = \sum_{i < j} f_{t_i t_j}(r_{ij})$$

Donde la suma de todos los pares de átomos, t_i y t_j , que se pueden mover con respecto a otro, normalmente excluyendo de 1 a 4 interacciones, son definidos por un conjunto de funciones de interacción $f_{t_i t_j}$ con respecto a la distancia interatómica r_{ij} . Este valor es determinado por la suma de cada una de las contribuciones de la interacciones intermoleculares e intramoleculares:

$$c = c_{inter} + c_{intra}$$

Las funciones de interacción son definidas en relación con la distancia superficial de cada par de átomos. Cada valor está determinado por valores predeterminados para cada par de átomos dependiendo del tipo de interacción y esta se determina en relación a la distancia entre uno y otro.³⁶

Estos dos softwares, ampliamente utilizados en el DiFAC, tienen ventajas y desventajas uno respecto del otro, dependiendo del objetivo buscado. Por ejemplo, una ventaja que tiene *autodock 4.2.6* es que se pueden llevar a cabo ensayos de acoplamiento tomando en cuenta átomos metálicos en coordinación como el Zn, el acoplamiento del ligando en cuyo caso se necesite la presencia explícita del agua, o el acoplamiento de ligandos con macrociclos en su estructura. Sin embargo, *autodock Vina* tiene la ventaja de arrojar resultados más rápido, debido a la menor cantidad de procesamiento requerida en su algoritmo de búsqueda y con la misma precisión que *autodock 4.2.6*.³⁷⁻³⁹

4 Antecedentes

El primer indicio del uso de agentes anticonvulsivos está dado en el año 1857, en un artículo publicado en *The Lancet*, donde se hace referencia del uso de bromuro de potasio como agente anticonvulsivo para *mujeres histéricas*, cuyas convulsiones se creía que estaban relacionadas con su periodo menstrual.⁴⁰ Después de ese hecho, se sabe que el fenobarbital fue sintetizado por primera vez por el químico Emil Fischer en 1911, y el posterior descubrimiento de sus propiedades anticonvulsivas por el psiquiatra Alfred Hauptmann, aunque el primer uso fue como agente hipnótico. Posteriormente el descubrimiento de la fenitoína por Tracy Putnam con la ayuda de Frederic Gibbs en 1934, seguido de la etosuximida en la década de los 1940 por Parke Davis, la Carbamazepina en 1953 por Schindler at

Geigy, y el valproato sódico en 1963 por Pierre Eymard (Ilustración 4-1). Este último fármaco es utilizado ampliamente en la práctica clínica como tratamiento de primera línea en diferentes síndromes epilépticos. Su mecanismo de acción aun no es del todo conocido, sin embargo, se ha demostrado acción sobre la transmisión GABAérgica incrementando la síntesis de GABA, reduciendo la liberación de ácido β -hidroxibutírico, así como la inhibición de receptores como el de NMDA, canales de calcio y sodio, además de una modulación serotoninérgica y dopaminérgica. Sin embargo, al tener un efecto en la inhibición de la deacetilasas de histonas, se convierte en un potencial teratógeno durante el desarrollo embrionario, por lo cual está completamente prohibido durante el embarazo.⁴⁰⁻⁴²

Las benzodiacepinas son un grupo farmacológico importante en el tratamiento de las crisis convulsivas, síndromes epilépticos y utilizadas ampliamente como anestésicos.⁴⁰ La primera benzodiacepina fue sintetizada en 1955, el clordiazepóxido, fármaco encontrado por serendipia mientras trabajaba en Hoffmann-La Roche por Leo Sternbach, comercializada en 1960 con el nombre de *Librium*. Tres años después comienza la comercialización por el mismo laboratorio del diazepam bajo el nombre de *Valium*.⁴³ Todos estos agentes tienen como objetivos generales, inhibir la respuesta excitatoria o aumentar la respuesta inhibitoria actuando por medio de distintos mecanismos de acción.^{40,44}

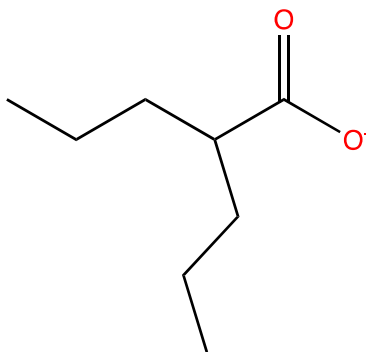


Ilustración 4-1 Forma ionizada del ácido valproico a pH fisiológico, fármaco utilizado ampliamente en la práctica clínica para el tratamiento de diversos síndromes epilépticos.

La búsqueda de nuevos fármacos antiepilépticos ha continuado. El descubrimiento de los diferentes mecanismos fisiopatológicos de la epilepsia, así como de diferentes enfermedades relacionadas con los niveles bajos del neurotransmisor

GABA como la corea de Huntington, enfermedad de Parkinson, Alzheimer y discinesia tardía,²³ han llevado a la búsqueda de moléculas que tengan dianas más específicas tratando de evitar los efectos adversos presentes en los fármacos ya conocidos.

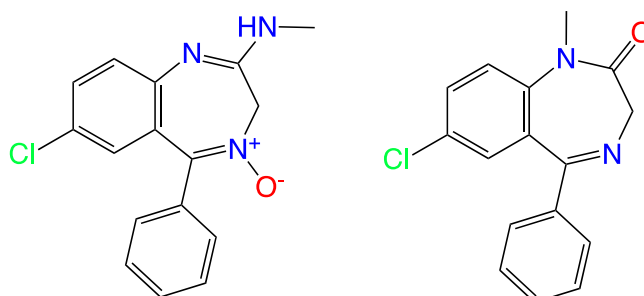


Ilustración 4-2 benzodiazepinas *Librium* y *Valium* respectivamente

La vigabatrina (Ilustración 4-3) fue desarrollada en 1977 por Lippert y cols.,⁴⁵ aprobada para ser comercializada como mezcla racémica en el 2009 bajo el nombre de Sabril®, siendo el enantiómero (S)-(+)-4 el activo. Actualmente es el único inhibidor irreversible de la GABA-AT comercializado.⁴⁶ Se utiliza en la clínica para tratar epilepsia parcial resistente con o sin generalización secundaria (combinando otros antiepilépticos), así como en los espasmos infantiles (en monoterapia),⁴⁷ tiene como mecanismo de acción inactivar la GABA-AT reaccionando con el PLP en el sitio activo de forma irreversible. Sin embargo, la gran cantidad de dosis administrada (1 – 3 g por día) y los efectos secundarios que trae el tratamiento crónico con este fármaco, como el daño irreversible en la retina en alrededor de entre 25 y 40% de los pacientes, esto atribuido al mismo grupo vinilo el cual ese comporta como un aceptor tipo Michael que por un lado le da la característica de su inhibición irreversible sobre la GABA-AT, sin embargo durante este mecanismo, este aceptor puede reaccionar con diferentes moléculas creándose así diferentes metabolitos los cuales están involucrados en dicho efecto adverso.^{2,23} Esto lleva a la búsqueda de nuevos inhibidores de GABA-AT, buscando mejorar la eficacia y disminuir la toxicidad, así evitando los efectos secundarios que tiene a consecuencia de los metabolitos que se generan durante la reacción de inhibición de la vigabatrina, que se cree, uno de ellos es lo que causa los efectos secundarios como artralgia, visión borrosa, confusión, depresión, diplopía, fatiga, aumento de peso,

marcha anormal, ataxia, tos, diarrea, somnolencia, deterioro de la memoria, temblor, irritabilidad y dolor faringolaríngeo.²⁰

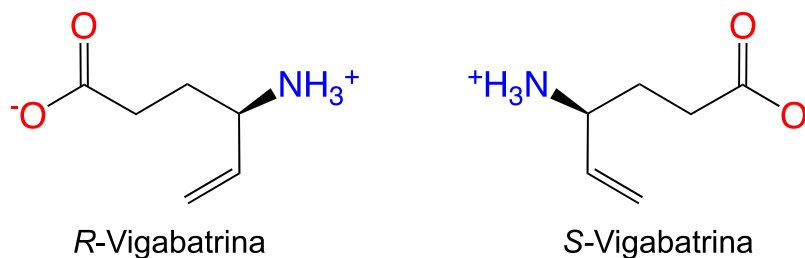


Ilustración 4-3 Par enantiomérico del inhibidor irreversible de la GABA-AT, γ -vinil-GABA (vigabatrina).

Yue Pan, Jian Qiu y Richard B. Silverman en 2003 publicaron un artículo en el que se había reportado previamente un ligando análogo conformacional rígido de vigabatrina (Ilustración 4-4), sin embargo, este resultó no ser inactivador de GABA-AT, sin embargo, fue un buen sustrato con una constante de especificidad de unión cinco veces más grande que GABA. Posteriormente mediante acoplamiento molecular, determinaron que el doble enlace endocíclico no estaba en la correcta orientación para la adición tipo Michael y tampoco era una enamina efectiva para la inactivación irreversible de la enzima. Con base en estos resultados realizaron el diseño de un nuevo ligando con el doble enlace exocíclico (Ilustración 4-4) el cual tuvo un efecto inhibitorio sobre GABA-AT, pero cuando el 2-mercaptoetanol, utilizado en los ensayos enzimáticos para crear el medio reducido necesitado por la enzima, era agregado para la reacción conjugada de GABA-AT, la inactivación no ocurría debido a que el aceptor tipo Michael de la propia molécula es un buen electrófilo y por lo tanto se cree que reaccionaba con los tioles del 2-mercaptoetanol, inhibiendo el mecanismo de acción de la misma. Debido a esto realizaron el diseño de otro análogo sustituido con el grupo difluoruro, el ácido (1S,3S)-3-amino-4-difluorometileno-1-ciclopentanoico (CPP-115) (Ilustración 4-5), el cual resultó ser 186 veces más efectivo inactivando GABA-AT, que vigabatrina. Además, este ligando no inactiva o inhibe enzimas como la alanina aminotransferasa y la aspartato aminotransferasa. Actualmente CPP-115 ha completado la fase 1 de los ensayos clínicos.^{22,48}

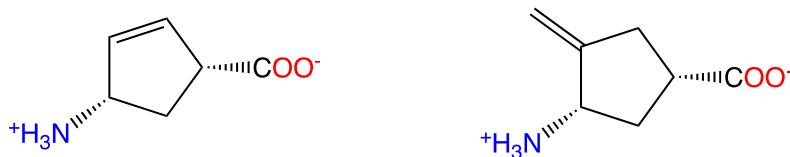


Ilustración 4-4 Análogos conformacionales rígidos de vigabatrina con doble enlace endocíclico y con el doble enlace exocíclico respectivamente, este último, inhibidor de GABA-AT.

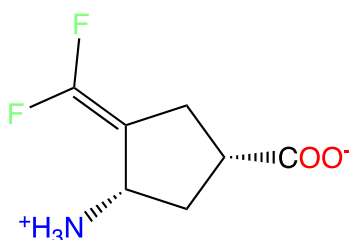


Ilustración 4-5 Ácido (1S,3S)-3-amino-4-difluorometilen-1-ciclopentanoico (CPP-115).

Cada vez se vuelven más específicos los estudios que se hacen sobre estos fármacos debido a los nuevos métodos computacionales, como son el acoplamiento molecular automatizado (*molecular docking*), estudios de similitud molecular y las relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR, por sus siglas en inglés).⁴⁹

En México Tovar-Gudiño *et al.*, en 2018 realizaron el diseño y síntesis de una serie de ligandos donde el (*R, S*)-3-(4-clorociclohexil)-4-(pirrolidin-1-il)-1,1-butanodiol y el (*R, S*)-5-metil-3-(pirrolidin-1-ilmetil)-1,1-hexanodiol, análogos del ácido β -(*p*-clorofenil)- γ -aminobutírico (Baclofeno) y (*S*)-pregabalina, respectivamente (Ilustración 4-6), fueron candidatos eficaces en la inhibición de la enzima GABA-AT presente en el complejo GABasa de *Pseudomonas fluorescens in vitro* e *in silico*, además realizaron el estudio computacional de dichos ligandos con respecto al análisis de similitud molecular (QSAR), así como el estudio de acoplamiento molecular (*molecular docking*) para explicar su carácter inhibitorio basado en diferentes parámetros estructurales y electrónicos sobre la enzima GABA-AT humana, resultando mejor candidato el ácido (4-clorofenil)-4-(pirrolidin-1-il)butanoico para pruebas biológicas *in vitro* para corroborar su actividad inhibitoria sobre la enzima.⁵⁰

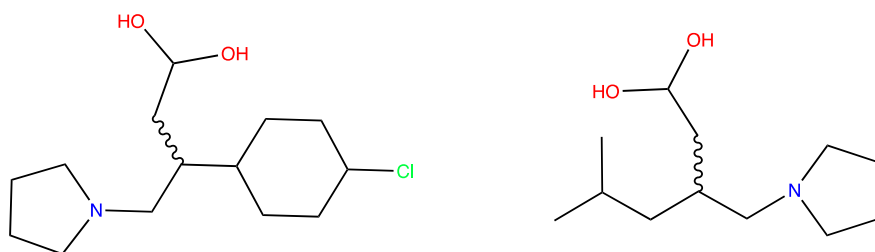


Ilustración 4-6 (*R, S*)-3-(4-clorociclohexil)-4-(pirrolidin-1-il)-1,1-butanodiol y el (*R, S*)-5-metil-3-(pirrolidin-1-ilmetil)-1,1-hexanodiol, análogos de ácido β-(*p*-clorofenil)-γ-aminobutírico (Baclofeno) y (*S*)-pregabalina, respectivamente.

En 2015 Hoang V. Le, Dustin D Hawker, *et al.*, realizaron el diseño de una serie de derivados de tetrahidrotiofenos, para lo cual solo dos fueron débiles inhibidores reversibles, mientras otros dos fueron potentes inactivadores de la GABA-AT. El ácido (2*S*,4*S*)-4-aminotetrahidrotiofen-2-2-carboxílico fue 8 veces más eficiente como inactivador de GABA-AT que vigabatrina, y con una rapidez de inactivación casi 20 veces mayor, mientras que el ácido (2*R*,4*S*)-4-aminotetrahidrotiofen-2-2-carboxílico (Ilustración 4-7) solo fue la mitad de eficiente que vigabatrina. Además, mencionan que el ácido (2*S*,4*S*)-4-aminotetrahidrotiofen-2-2-carboxílico unido al PLP como metabolito, forma una interacción entre el átomo de azufre y el grupo carboxilo de Glu270, la cual puede ser la primera interacción de ese tipo reportada y que contribuye a la estabilización del metabolito en el sitio activo de GABA-AT.²⁰

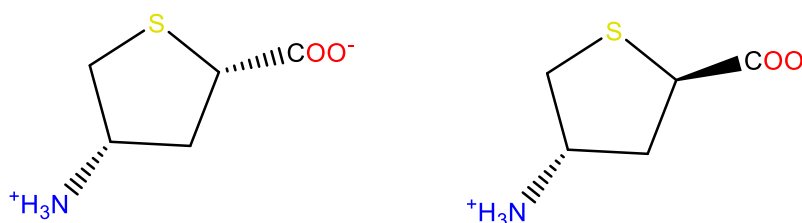


Ilustración 4-7 Ácido (2*S*,4*S*)-4-aminotetrahidrotiofen-2-2-carboxílico y el ácido (2*R*,4*S*)-4-aminotetrahidrotiofen-2-carboxílico respectivamente.

En el 2013 Hira Iftikha, Siadra Batool, *et al.*, presentaron un trabajo donde realizaron la evaluación *in silico*, utilizando la técnica de acoplamiento molecular (*docking*) de una serie de ligandos derivados del ácido 4-(1,3-dioxoisindolin-2-il) butanoico que previamente habían sido sintetizados y evaluados, resultando ser buenos

inhibidores de GABA-AT en pruebas *in vitro*. Utilizando como templete el cristal de GABA-AT de *Sus scrofa* (PDB-ID: 1OHV) realizaron el modelado de GABA-AT humana utilizando servidores en línea, obteniendo mediante el análisis del gráfico de Ramachandran, que el 99% de los residuos se encontraban en regiones permitidas de ángulos diedros válidos y ninguno de los residuos del sitio activo se encontró en un sitio no permitido. El acoplamiento se realizó sobre las dos enzimas (templete y modelo) utilizando *Autodock 4.2* obteniendo valores de energía de enlace entre proteína-ligando (ΔG de unión) para GABA-AT de *Sus scrofa* en un rango de -7.11 a -9.29 Kcal/mol y para la humana de -6.89 a -8.34 Kcal/mol, además de que todos los ligandos se unieron en un mismo sitio (Ilustración 4-8). Los aminoácidos involucrados en las interacciones de estos ligandos en *Sus scrofa* fueron Gly136, Asp298, Thr353, Gln301, Ser137A y Arg192, mientras que para *Homo sapiens* fueron Gly164, Asp326, Thr381, Gln329, Ser165 y Arg220.

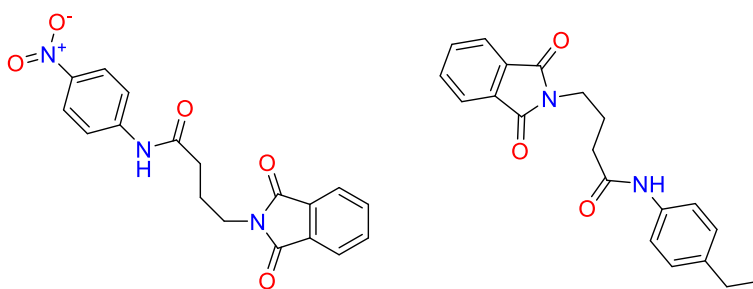


Ilustración 4-8 Dos de los derivados del ácido 4-(1,3-dioxisoindolin-2-il) butanoico con mejor energía de unión a las dos enzimas, la 4-(1,3-dioxisoindolin-2-il)-N-(4-nitrofenil) butanamida y 4-(1,3-dioxisoindolin-2-il)-N-(4-etilfenil) butanamida respectivamente.

4.1 N-pantoilGABA

N-pantoilGABA fue sintetizado en 1971 a partir de Pantolactona y GABA como posible fármaco para tratar enfermedades mentales, ya que se sabía que este atravesaba barrera hematoencefálica al contrario de GABA.⁵¹ Los enantiómeros de la pantolactona son ampliamente utilizados en la síntesis orgánica enantioselectiva, y se han propuestos varios métodos para resolver la mezcla enantiomérica.⁵²⁻⁵⁴ La síntesis de varias amidas con la apertura amínica partiendo de la pantolactona han sido realizados a partir de varios métodos propuestos, utilizando aminas como bases fuertes en la formación del nucleófilo amínico del GABA.^{51,55,56} La sal de calcio

del ácido *D*-homopantoténico fue aprobada en 1977 para la práctica clínica en Rusia.⁵⁷ Actualmente este fármaco se encuentra en venta bajo el nombre de Pantogam® en presentación de comprimidos de 250 y 500 mg en dicha nación. Sus indicaciones van desde afectaciones cognitivas debido a diferentes condiciones en el SNC, incluyendo consecuencias de neuroinfecciones y traumatismos, esquizofrenia, insuficiencia cerebrovascular, hipercinesis extrapiramidales, epilepsia en combinación con otros anticonvulsivos para mejorar la desaceleración cognitiva como efecto secundario de algunos antiepilépticos entre algunos otros.

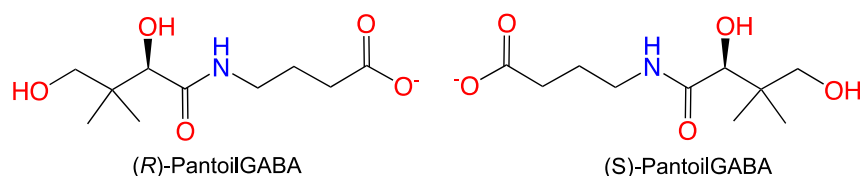


Ilustración 4-9 Enantiómeros de *N*-pantoilGABA, utilizado en el tratamiento de déficits cognitivos y como coadyuvante en el tratamiento de síndromes epilépticos.

Es poca la evidencia que se encuentra de este fármaco. En Rusia se comercializa los estereoisómeros *D* y *L* (*R* y *S*, respectivamente) de la sal de calcio de *N*-pantoilGABA, sin embargo, se ha demostrado que el enantiómero *R* es el que tiene mayor interacción sobre los diferentes blancos. Se ha comprobado que el efecto directo de *N*-pantoilGABA recae en la unión a los canales iónicos de GABA tanto A y B, e indirecto mediante la modulación sobre otros sistemas como el colinérgico aumentando la biosíntesis de acetilcolina principalmente en la corteza cerebral y dopaminérgico interactuando con los receptores de dopamina D2 incrementando los niveles de esta sobre todo en ganglios basales. También, se menciona que no suele crear adicción así como que presenta una baja toxicidad y se puede utilizar para las diferentes patologías antes mencionadas.⁵⁷⁻⁶³

5 Planteamiento del problema

El tratamiento farmacológico para los diferentes síndromes epilépticos aun contiene bemoles que interfieren en una respuesta eficaz; efectos adversos, altas dosis requeridas, farmacoresistencia, uso de polifarmacia, siendo los síndromes epilépticos suprarefractarios el mayor exponente de estas contrariedades.

6 Justificación

N-pantoilGABA es un medicamento aprobado para su venta en pocos países como Rusia. Tiene un efecto depresor sobre el SNC debido a su interacción directa sobre los receptores de GABA en el sistema GABAérgico, e indirecta por la interacción con otros sistemas como el colinérgico y dopaminérgico. Se utiliza en combinación con otros fármacos para el tratamiento de los síndromes epilépticos, además como neurotrópico y antipsicótico, demostrando baja toxicidad con pocos efectos adversos, además de que no crea dependencia. La búsqueda de fármacos análogos a *N*-pantoilGABA, es relevante para tratar de diluir los bemoles en el tratamiento contra la epilepsia.

7 Hipótesis

El diseño *in silico* y la síntesis de análogos de *N*-pantoilGABA que contengan como núcleo estructural la porción acíclica producto de la aminólisis de pantolactona con aminas análogas a GABA, interactuarán con mejores energías y modos de unión con proteínas del sistema GABAérgico, generando un efecto antiepiléptico en las pruebas *in vivo*.

8 Objetivos

8.1 Objetivo general

Diseñar y determinar los mejores candidatos en los ensayos *in silico* análogos a *N*-pantoilGABA que contengan aminas análogas a GABA en su estructura molecular, dirigidos a inhibir a la GABA-AT e interactuar con los receptores GABA_A, llevarlos a la síntesis orgánica producto de la apertura por aminólisis de la mezcla de (*R,S*)-

pantolactona para posteriormente evaluarlos *in vivo* utilizando el modelo de generación de crisis convulsivas inducidas por PTZ con el fin de determinar si existe un efecto anticonvulsivante producto de la modulación del sistema GABAérgico.

8.1.1 Objetivos particulares

- El diseño de análogos de *N*-pantoilGABA, derivados de la mezcla racémica de pantolactona con aminas análogas a GABA por adición del grupo amino al carbono carbonilo de la lactona y su apertura.
- Evaluar *in silico* las moléculas propuestas dirigidas a inhibir a la enzima GABA-AT e interactuar con el receptor de GABA_A mediante herramientas como el acoplamiento molecular (*Docking*) y la dinámica molecular, con el fin de estimar su posible actividad sobre el sistema GABAérgico.
- Sintetizar y caracterizar mediante RMN de ¹H y ¹³C a *N*-pantoilGABA y los mejores candidatos con el fin de correlacionar los resultados obtenidos *in silico* con lo experimental.
- Poner a prueba *in vivo* a *N*-pantoilGABA y los mejores candidatos sintetizados utilizando el modelo de crisis convulsivas inducidas con PTZ empleando como control positivo a valproato de sodio y vigabatrina.

9 Metodología

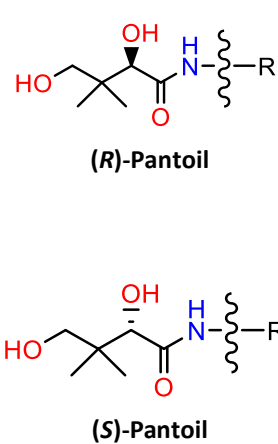
9.1 Ensayos *in silico*

Se propusieron estructuras análogas a *N*-pantoilGABA (11 y 12), de donde se tomó como ligando líder al par enantiomérico de pantolactona, realizando la apertura de esta mediante la adición de aminoácidos análogos a GABA. Se dibujaron por separado cada uno de los estereoisómeros resultantes de la apertura del par enantiomérico de la pantolactona y los enantiómeros de los aminoácidos utilizados para tal reacción según fuese el caso. (Tabla 9-1Error! Reference source not found.) Todas las estructuras se dibujaron con el software ACD/ChemSketch⁶⁴ y fueron convertidas a un formato 3D (Matriz-Z) con el programa GaussView5.0.⁶⁵ Posteriormente, se calcularon las formas ionizadas a pH fisiológico de las estructuras con el software MarvinSketch⁶⁶ a partir de estos resultados se optimizaron con el fin de encontrar las geometrías más estables determinando la

energía más cercana al mínimo global por cálculo adicional de las frecuencias vibracionales empleando un nivel de cálculo semiempírico y una base PM6 en un modelo solvatado CPCM (con agua como disolvente) respectivamente a través del software Gaussian 16W.⁶⁷ Así mismo, se realizó la optimización y el modelado siguiendo las mismas pautas descritas para ligandos control como GABA (**1**), el par enantiomérico de vigabatrina (**2** y **3**) y pantolactona (**5** y **6**), valproato (**4**), así como para los ácidos (*R*)- y (*S*)-2,4-dihidroxi-3,3-dimetilbutanoicos, estos últimos producto de la hidrólisis de la (*R*)- y (*S*)-pantolactona respectivamente.

9.1.1 Evaluación de propiedades fisicoquímicas ADME-Tox *in silico*

Para el diseño de los ligandos propuestos, se tomó en cuenta la regla de los 5's de Lipinski,⁶⁸ tratando así de obtener ligandos que presentasen un buen coeficiente de reparto (*LogP*) y por lo tanto una buena permeabilidad de membrana, aumentando la probabilidad de que estos crucen la barrera hematoencefálica. Además de reportar el valor del TPSA (*topological polar surface area*), para el cual el nivel óptimo en el caso de ligandos los cuales su blanco se encuentra en el SNC, es que sea menor de 90 Å².⁶⁹ Estas propiedades fueron evaluadas en los softwares Molinspiration Cheminformatics⁷⁰ y SwissADME⁷¹.



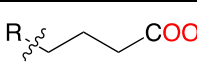
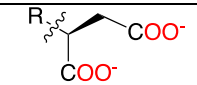
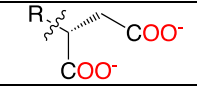
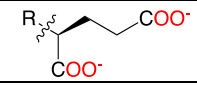
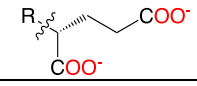
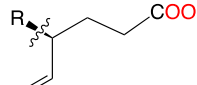
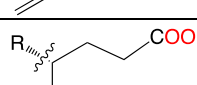
Sustituyente		Número	Nombre
H	(R)-Pantoil	9	(R)-2,4-dihidroxi-3,3-dimetilbutanamida
	(S)-Pantoil	10	(S)-2,4-dihidroxi-3,3-dimetilbutanamida
	(R)-Pantoil	11	(R)-N-pantoilGABA
	(S)-Pantoil	12	(S)-N-pantoilGABA
	(R)-Pantoil	13	Ácido (R)-pantoil-L-aspártico
	(S)-Pantoil	14	Ácido (S)-pantoil-L-aspártico
	(R)-Pantoil	15	Ácido (R)-pantoil-D-aspártico
	(S)-Pantoil	16	Ácido (S)-pantoil-D-aspártico
	(R)-Pantoil	17	Ácido (R)-pantoil-L-glutámico
	(S)-Pantoil	18	Ácido (S)-pantoil-L-glutámico
	(R)-Pantoil	19	Ácido (R)-pantoil-D-glutámico
	(S)-Pantoil	20	Ácido (S)-pantoil-D-glutámico
	(R)-Pantoil	21	(R)-pantoil-(S)-vigabatrina
	(S)-Pantoil	22	(S)-pantoil-(S)-vigabatrina
	(R)-Pantoil	23	(R)-pantoil-(R)-vigabatrina
	(S)-Pantoil	24	(S)-pantoil-(R)-vigabatrina

Tabla 9-1 Propuesta de ligandos tomando como núcleo estructural al par enantiomérico (R)- y (S)-2,4-dihidroxi-3,3-dimetilbutanamida, (R)-9 y (S)-10

9.1.2 Generación y validación de modelos 3D de la GABA-AT

Para llevar a cabo el reconocimiento molecular, se requirió de ambas isoformas de GABA-AT con la correspondiente extensión informática .pdb. No obstante, las estructuras cristalográficas de las GABA-AT de las que se tiene información y fueron relevantes para el presente trabajo, fueron las isoformas de *Sus scrofa* (PDB ID: 1HOV) y *Escherichia coli* (PDB ID: 1SZK). Estas fueron de utilidad en la generación de modelos 3D a partir de la secuencia de aminoácidos conocida de la enzima de humano (*Homo sapiens*) y de la bacteria *Pseudomonas fluorescens*. Esta última debido a que es con la que se cuenta en el laboratorio para realizar las pruebas *in vitro* y así poder realizar una correlación con los ensayos *in silico* e *in vivo*. En cada caso tanto la secuencia molde (templete) como la de la estructura 3D a generar (modelo), fueron alineadas buscando la mayor coincidencia entre secuencias, tomando especial atención de no omitir el orden y la totalidad de los residuos de aminoácido presentes en los sitios catalíticos activos.

Los modelos fueron generados a través de la plataforma bioinformática SWISS-MODEL.³³ El modelo de la isoforma de homo sapiens se generó a partir de la isoforma dimérica expresada por *Sus scrofa* (PDB ID: 1OHV) y el modelo correspondiente de *Pseudomonas fluorescens* a partir del tetrámero de *Escherichia coli* (PDB ID: 1SZK). Mediante el análisis gráfico de Ramachandran fueron evaluados los residuos de aminoácidos de las proteínas modeladas (ángulos phi y psi).

9.1.3 Optimización de los análogos de GABA

La estructura ionizadas a pH fisiológico y calculadas previamente, fueron modelados con el software GaussianView⁶⁵ optimizados con el paquete de programas Gaussian.⁶⁷ Para este fin se utilizó un nivel de teoría semi-empírico con una base PM6 mediante la optimización de las geometrías más el cálculo de las frecuencias vibracionales, en adición a la solvatación por moléculas de agua en un modelo CPCM, suficientes para obtener las estructuras de partida. Como estructuras de referencia del *Docking* y con el fin de dar validez del reconocimiento molecular, se emplearon, como se mencionó previamente, a GABA (**1**), el par enantiomérico de vigabatrina (**2** y **3**) y pantolactona (**5** y **6**), valproato (**4**), así como los ácidos (*R*)- y (*S*)-2,4-dihidroxi-3,3-dimetil butanoicos (**7** y **8**). Una vez recabada la información anterior, todas las estructuras optimizadas fueron convertidas a las extensiones informáticas necesarias para el reconocimiento molecular con las isoformas de la enzima de *Sus scrofa*, *Homo sapiens* y *Pseudomonas fluorescens*, estas dos últimas modeladas y validadas.

9.1.4 Preparación del *Docking* sobre los receptores GABA-AT

Una vez obtenidos los modelos por homología de las dos isoformas de GABA-AT y el cristal ampliamente empleado en el reconocimiento de candidatos a fármacos, además de los ligandos propuestos con el nivel mínimo de energía conformacional (cercano al global) en sus respectivas extensiones informáticas, estos fueron manipulados con el software *AutoDockTools* 1.5.6³⁶ A partir de este software, se generaron cada uno de los archivos necesarios para efectuar un *docking* “ciego” en el software *autodock vina*³⁶, indicándole al programa cada una de las torciones (a

partir de los grados de libertad) de las moléculas en estudio a considerar durante el ensayo.

9.1.5 Reconocimiento molecular

Se realizaron 1,000 ensayos de *docking* “ciego” de cada uno de los ligandos propuestos y los controles sobre las tres isoformas de GABA-AT propuestas en este trabajo (*Sus scrofa*, *Homo sapiens* y *Pseudomonas fluorescens*) a través del software Autodock *vina*.³⁶ Se determinó el sitio de unión más probable de los ligandos a partir del RMSD arrojado por *vina*. El RMSD (*root mean square deviation*) es un valor utilizado para determinar la desviación (diferencia de cuadrados) con respecto a un punto de partida en la caja que contiene a la molécula. *AutoDock Vina* selecciona arbitrariamente un átomo de la proteína al azar asignándole un valor de RMSD igual a 0 y a partir de este punto de referencia espacial determina la posición del sitio de unión del ligando en un *docking* “ciego” medido en unidades de RMSD.³⁵ Para esto se tomaron en cuenta intervalos de RMSD de 1 unidad a partir del 0 hasta el 48 (0-1, 1-2, 2-3 ... 47- 48), debido a que el valor más alto de RMSD (distancia más alejada del punto de referencia) arrojado por *vina* fue de 47, cotejando así, a partir de 1,000 ensayos de *docking* “ciego” para cada ligando, que intervalo resultaba con mayor frecuencia y por ende el sitio de unión más frecuente. Esto se reportó como % de veces que el ligando se unió en ese sitio de la proteína por cada 1,000 ensayos. A partir de todos los resultados del sitio de unión con mayor frecuencia encontrados, se eligió de entre todos el que tenía ΔG más exergónico. Este fue convertido a la extensión informática correspondiente y posteriormente se analizaron las interacciones resultantes con los aminoácidos del sitio de unión más probable de la respectiva proteína.

El sitio activo de la GABA-AT humana se determinó tomando en cuenta el de *Sus scrofa*, alineando y superponiendo las secuencias de aminoácidos de las dos proteínas, mientras que para *P. fluorescens* los aminoácidos que conforman el sitio activo fueron: Ile51, Gln80, Ser113, Tyr139, Arg142, Tyr156, Gly211, Asp240, Val242, Gln243, Lys269, Ser270 Gly296, Thr298, Leu389 y Arg399 en acuerdo con la literatura.^{72,73}

9.1.6 Ensayos *in silico* del receptor GABA_A

Para los ensayos *in silico* sobre el receptor GABA_A se tomó el modelo reportado por Bergmann y colaboradores,²⁴ haciendo el tratamiento del mismo utilizando el software AutoDock Tools,⁷⁴ y posteriormente utilizando la plataforma CHARM GUI⁷⁵, el receptor se incrustó en una membrana bilipídica y se generaron los archivos con las instrucciones del ensayo en el formato requerido, compatibles con el software GROMACS.⁷⁶ Primero se realizó la minimización y equilibración de cargas del sistema, para finalmente ejecutar el ensayo de dinámica molecular a un tiempo de 120 ns. Se empleó el software VMD⁷⁷ para manipular los resultados de la dinámica, tomando las conformaciones a los tiempos de 0, 60 y 120 ns como plantillas para los ensayos de *docking*, utilizando el mismo esquema para las isoformas de la enzima GABA-AT antes mencionadas.

9.2 Síntesis y caracterización de los análogos de GABA

De los resultados obtenidos en los ensayos *in silico*, se seleccionaron los análogos de *N*-pantoilGABA con mejor energía de enlace y acoplamiento molecular para ser obtenidos mediante una metodología sintética viable. Se realizó el diseño de la síntesis *free solvent*, esto con la finalidad de llevar a cabo prácticas de *green chemistry*. La caracterización de los ligandos obtenidos se realizó mediante resonancia magnética nuclear de protón y carbono.

9.3 Ensayos biológicos *in vivo*

Como parte de la evaluación de la interacción con el sistema GABAérgico de los ligandos propuestos, se realizaron los ensayos biológicos *in vivo*.

En la determinación de la dosis letal media (DL₅₀) por medio del método de Lorke⁷⁸ y determinación de la actividad anticonvulsivante utilizando el modelo de inducción de convulsiones con PTZ se emplearon ratones macho de la cepa CD-1 de 8 a 12 semanas de edad y con un peso promedio de 35 g.

Todos los manejos realizados con los animales cumplieron con los requerimientos estipulados por la NOM-062-ZOO-1999.⁷⁹ Los animales de experimentación se

mantuvieron bajo condiciones de luz controlada 12h (9:00 – 21:00 horas), además de agua y alimento *ad libitum*. Todos los animales estudiados fueron eutanizados considerando lo que dicta la NOM-033-ZOO-1995,⁸⁰ y en apego a la normatividad del reglamento del Comité Interno para el Cuidado y Uso de animales de Laboratorio (CICUAL-IPN) de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional (ESM-IPN).

La vía de administración de las mezclas racémicas sintetizadas y purificadas fue intraperitoneal, mientras que la vía de administración del PTZ fue subcutánea debido a la cercanía con el SNC y por supuesto, tratar de no intervenir en su absorción ya que los ligandos propuestos fueron administrados por vía ip. Se utilizó solución salina fisiológica al 0.9% como vehículo de todas las sustancias administradas.

10 Resultados y discusión

10.1 Validación de propiedades fisicoquímicas y ADME-Tox *in silico*

Una vez que las moléculas representadas en la Tabla 9-1 fueron dibujadas con el programa MarvinSketch 6.0.0⁶⁶ se determinó la forma ionizada a pH fisiológico (7.4) con el mismo programa a una temperatura de 298 K. Con los resultados arrojados por el software, y estas se introdujeron a la plataforma SWISS-ADME⁷¹ y Molinspiration⁷⁰ para determinar las propiedades enlistadas en la Tabla 10-1. Cabe mencionar que dichos softwares, no hacen distinción entre estereoisómeros, por lo que se agruparon en diastereoisómeros para mostrar las propiedades por cada grupo.

MOLÉCULAS	LOGP*	TPSA Å ² *	P-GP SUBSTRATO**	GI ABSORCIÓN**	VIOLACIONES A LA REGLA DE LOS 5'S DE LIPINSKI**	PERMEANTE A BHE**
1	-1.10	63.32	No	Alta	0	No
2,3	-3.11	66.15	No	Alta	0	No
4	0.09	40.13	No	Alta	0	Si
5,6	-0.60	46.53	No	Alta	0	No
7,8	-3.27	80.58	No	Alta	0	No
9,10	-1.07	83.55	No	Alta	0	No
11,12	-3.63	109.68	No	Alta	0	No
13,14,15,16	-4.42	149.81	No	Baja	0	No
17,18,19,20	-4.22	149.81	No	Baja	0	No
21,22,23,24	-3.00	109.68	No	Alta	0	No

Tabla 10-1 Valores calculados a partir de las formas ionizadas a pH fisiológico con los softwares molinspiration* y SwissADME **

Se puede observar que el único ligando que obtiene un LogP positivo es el valproato, esto debido a su carácter hidrofóbico propio de su estructura molecular, sin embargo, los demás ligando obtuvieron valores de LogP negativos, esto atribuido a los grupos polares distribuidos dentro de las estructuras, como los son los hidroxilos de la parte del grupo pantoilo, además de la amida en caso de ligandos propuestos y amina en el caso de los aminoácidos GABA y vigabatrina. Esto último viéndose reflejado en la columna de permeabilidad a la barrera hematoencefálica predicha, cuyo único ligando con probabilidad de cruzar es el valproato. Ninguno de los ligandos resulto ser sustrato de la glucoproteína-P y ninguno incumple con algún punto de las reglas de los cinco de Lipinski. Cabe mencionar que los ligandos

enantiómericos propuestos de pantoilAspartato y pantoilglutamato resultaron tener una baja probabilidad de ser absorbido por vía gastrointestinal.

10.2 Generación de los modelos

Los modelos de las proteínas de GABA-AT humana y de *Pseudomonas fluorescens* fueron modelados en la plataforma SwissModel.³³ Los modelos fueron validados a través de la misma plataforma haciendo el análisis del gráfico de Ramachandran (Ilustración 10-1) y el porcentaje favorecido de los ángulos diedros (ángulos ϕ y ψ) entre aminoácidos.

En el caso del modelo de GABA-AT humana, se tomó como template el cristal de *Sus scrofa* (PDB ID: 1OHV) con 96% de identidad en su secuencia de aminoácidos y con 92% de cobertura. Obteniendo 96.08% de ángulos diedros favorecidos, 0.65% de valores atípicos en estos y solo 2.02% de rotámeros atípicos. En el caso del modelo de GABA-AT de *Pseudomonas fluorescens* esta fue modelada a partir del template de *Escherichia coli* (PDB ID: 1SZK) con un 73.93% de identidad en su secuencia de aminoácidos y con 97% de cobertura. Obteniendo un 95% de ángulos diedros favorecidos, 0.89% de valores atípicos en estos y solo 0.39% de rotámeros atípicos.

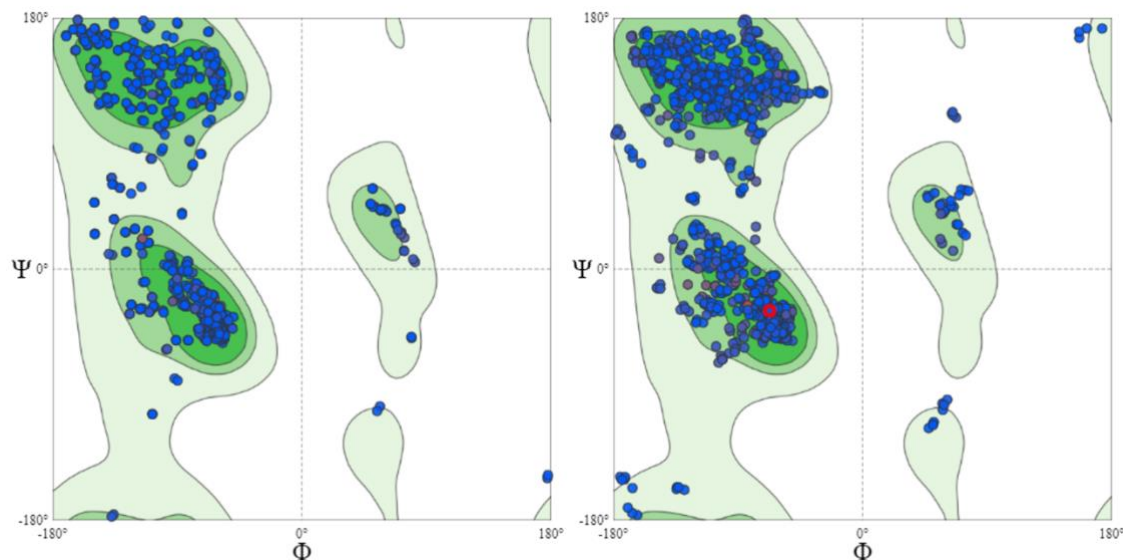


Ilustración 10-1 Gráficos de Ramachandran en general para GABA-AT Humana y de *P. fluorescens* modeladas utilizando como templete *Sus Scrofa* (PDB ID: 1OHV) y *Escherichia coli* (PDB ID: 1SZK) respectivamente, se puede notar que los aminoácidos caen dentro de las áreas sombreadas y son pocos lo que se salen de estas, esto correlacionando una buena conformación con respecto a los ángulos diedros.

10.3 Resultados de Docking

10.3.1 Docking sobre el cristal de PDB:ID 1OHV

Para el cristal de GABA-AT de *Sus scrofa* (PDB-ID: 1OHV), los resultados de *docking* “ciego” se muestran en la Tabla 10-2. A primera vista se puede observar que el ΔG de unión de los ligandos propuestos se vuelve más exergónico con la porción acíclica de pantolactona para el caso de GABA y los enantiómeros de vigabatrina unida a su estructura por un enlace amida, gracias a sus contribuciones adicionales de aceptores y donadores de puentes de hidrógeno al reconocimiento. Todos los ligandos con la porción acíclica de la pantolactona en su estructura mostraron un ΔG más exergónico que las moléculas propuestas sin la porción acíclica, (controles y el VAS) gracias a la amida formada y el hidroxilo más la porción hidrofóbica correspondiente en adición a GABA.

Se puede mencionar que los 4 diastereoisómeros de *N*-pantoilVigabatrina (**21**, **22**, **23** y **24**) junto con el diastereoisómero **14** de *N*-pantoilaspartato (**14**) resultaron ser las 5 moléculas más exergónicas al reconocimiento. GABA fue el ligando menos

exergónico debido a que solo posee un grupo aceptor y un donador de puentes de hidrógeno.

Ligando	Número	ΔG	pKd	Ligando	Número	ΔG	pKd
pant_R_Viga_S	21	-7.3	-5.4	pant_S_D_Asp	16	-6.3	-4.6
pant_S_Viga_S	22	-7.2	-5.3	pant_R_L_Glu	17	-6.1	-4.5
pant_S_Viga_R	24	-7.2	-5.3	PLC_R	6	-5.6	-4.1
pant_S_L_asp	14	-7.0	-5.1	S_VGB	2	-5.2	-3.8
pant_R_Viga_R	23	-7.0	-5.1	R_VGB	3	-5.2	-3.8
pant_R_GABA	11	-6.8	-5.0	VAS	4	-5.2	-3.8
pant_S_GABA	12	-6.8	-5.0	pant_R	9	-5.2	-3.8
pant_R_D_Glu	19	-6.8	-5.0	pan_R	7	-5.1	-3.7
pant_R_L_asp	13	-6.6	-4.8	pan_S	8	-5.1	-3.7
pant_S_L_Glu	18	-6.6	-4.8	PLC_S	5	-5.0	-3.7
pant_S_D_Glu	20	-6.5	-4.8	pant_S	10	-4.9	-3.6
pant_R_D_Asp	15	-6.4	-4.7	GABA	1	-4.5	-3.3

Tabla 10-2 Resultados de *docking* ciego con *AutoDock Vina* sobre 10HV, se puede notar el aumento en la energía de enlace por parte de los ligandos que contienen el núcleo pantoilo en su estructura.

Después de realizar la selección del resultado de *docking* ciego a partir del sitio con mayor frecuencia de unión y más exergónico (procedimiento previamente descrito) se revisaron las interacciones entre el ligando y la proteína, cotejando si existía interacción con alguno de los aminoácidos del sitio catalítico activo (Tabla 10-3).

Ligando	No	Arg 192A	Thr 353B	Lys 329A	% de unión al sitio más probable
GABA	1	✓	✓		34.6
pant_R_GABA	11	✓	✓		37.2
pant_S_GABA	12	✓	✓		37.0
pant_R_L_asp	13			✓	62.3
pant_S_L_asp	14			✓	65.1
pant_R_D_Asp	15			✓	51.6
pant_S_D_Asp	16			✓	59.2
pant_R_L_Glu	17			✓	57.7
pant_S_L_Glu	18				56.6
pant_R_D_Glu	19			✓	46.2
pant_R_Viga_S	21	✓	✓		39.4
pant_S_Viga_S	22				24.4
pant_R_Viga_R	23	✓	✓		50.8
pant_S_Viga_R	24	✓	✓	✓	45.7

Tabla 10-3 Interacciones encontradas entre aminoácidos del sitio activo de la estructura del cristal de 10HV y cada ligando. Solo se muestran los ligandos que resultaron con interacciones hacia los aminoácidos del sitio activo como sitio de unión más probable.

Para GABA, que es el ligando endógeno a mejorar en su proceso de neurotransmisión, solo se presentaron dos interacciones con Arg192A y Thr353B, interacciones reportadas en múltiples referencias,^{2,20-22,50} con 34.6% de probabilidad de unión a este sitio, en cambio, ninguno de los dos enantiómeros de vigabatrina, VAS o los controles utilizados presentó alguna interacción con alguno de los aminoácidos del sitio de activo. Por otro lado, el diastereoisómero **24** de *N*-pantoilVigabatrina fue el que presentó un mayor número de interacciones con los aminoácidos del sitio activo y tuvo una probabilidad de unión a tal sitio del 45.7%. Los diastereoisómeros **22**, **18**, y **20** no presentaron interacciones con ningún aminoácido, a pesar de permanecer cerca del sitio activo. El diastereoisómero de *N*-pantoilaspartato **14**, tuvo un 65.1% de probabilidad de unión en ese sitio, sin embargo, en el análisis de las interacciones solo presentó una con Lys329A. Los 1,000 resultados del *docking* ciego sobre la enzima de cada uno de los ligandos propuestos y controles fueron superpuestos para observar el patrón de unión registrado. Con esto se pudo visualizar que los ligandos propuestos con el fragmento pantoilo, (con mayor energía de unión y número de interacciones hacia aminoácidos del sitio activo en aproximadamente 50% de las veces) se unieron cerca o dentro del sitio activo de la cadena A de la enzima, mientras que aproximadamente el otro 50% se unió en el otro sitio activo de la cadena B, siendo que esto no ocurrió con ninguno de los controles incluyendo al propio GABA, para los cuales hubo más entropía (desorden) en los sitios de unión (Figura 10-1).

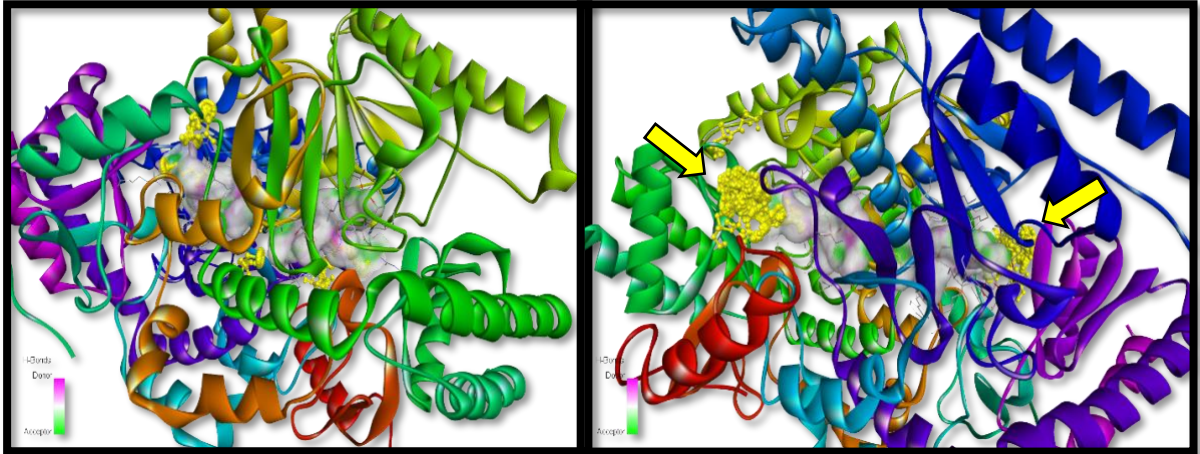


Figura 10-1 Resultados del *docking* ciego superpuestos en el cristal 1OHV entre la GABA-AT y Pant_R_Viga_S (21), con el ΔG menos exergónico y el más exergónico (respectivamente de -4.5 y -7.3 kJ/mol). Los ligandos se muestran en amarillo, los sitios activos están representados por la superficie dibujada en el centro de la enzima (mapa mostrado en forma de nube electrostática al interior). Las flechas indican los sitios de unión más frecuentes para el ligando 21. Cabe mencionar que los sitios de unión para GABA quedaron más dispersos respecto de los ligandos propuestos.

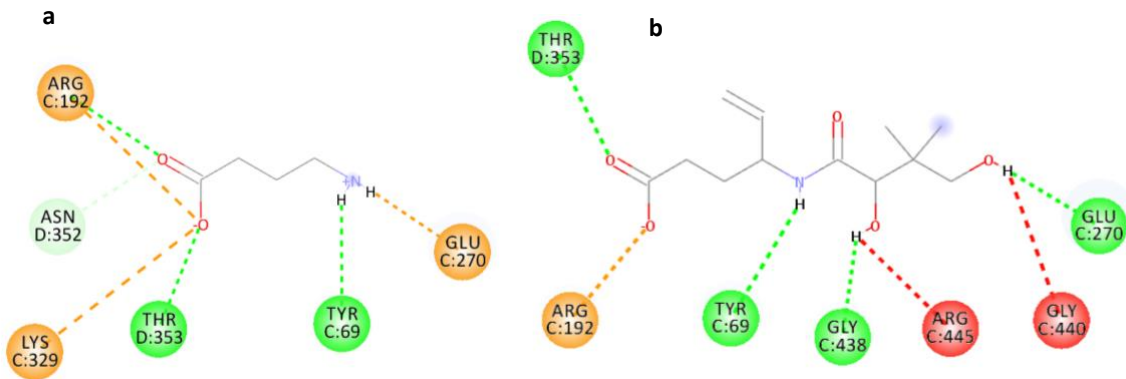


Ilustración 10-2 Representación 2D de las interacciones dadas en el sitio activo de 1OHV para GABA (a) y Pant_R_Viga_S (b) en el sitio de mayor probabilidad de unión en *docking* ciego.

En la Ilustración 10-2 se observa que el ligando GABA y el diastereoisómero 21 de *N*-pantoilVigabatrina (ligando con el mejor ΔG al reconocimiento) compartieron interacciones por puentes de hidrógeno en el sitio activo con los aminoácidos Arg192, Glu270, Tyr69 y Thr353, no siendo así el caso de la Lys329, para la cual GABA, se presentó con una interacción de tipo puente de sal entre el oxígeno

desprotonado del ácido carboxílico y la amina de la Lys con una distancia de 4.362 Å, mientras que para el ligando 21 no se mostró tal interacción. Sin embargo, cuando se realizó el análisis de las interacciones, se encontró que la Lys329 queda a una distancia aproximadamente igual (4.394 Å) entre el nitrógeno de la Lys329 y el oxígeno carboxílico del ligando 21, quedando más alejado el carbono con carga negativa (Ilustración 10-3). Esto último orientando a que el grupo vinilo tuvo una gran influencia en la torción de la porción de GABA, ya que a diferencia de los ligandos derivados de vigabatrina, *N*-pantoilGABA si mostró tal interacción de puente de sal con Lys329. Cabe resaltar la interacción de puente de hidrogeno que en los diferentes diasterómeros de *N*-pantoilVigabatrina y *N*-pantoilGABA se mostró entre el oxígeno carbonílico de la Gly438 y el hidrógeno del hidroxilo de la posición 2 de la fracción pantoilo, presente en todos los ligandos que quedaron dentro del sitio catalítico.

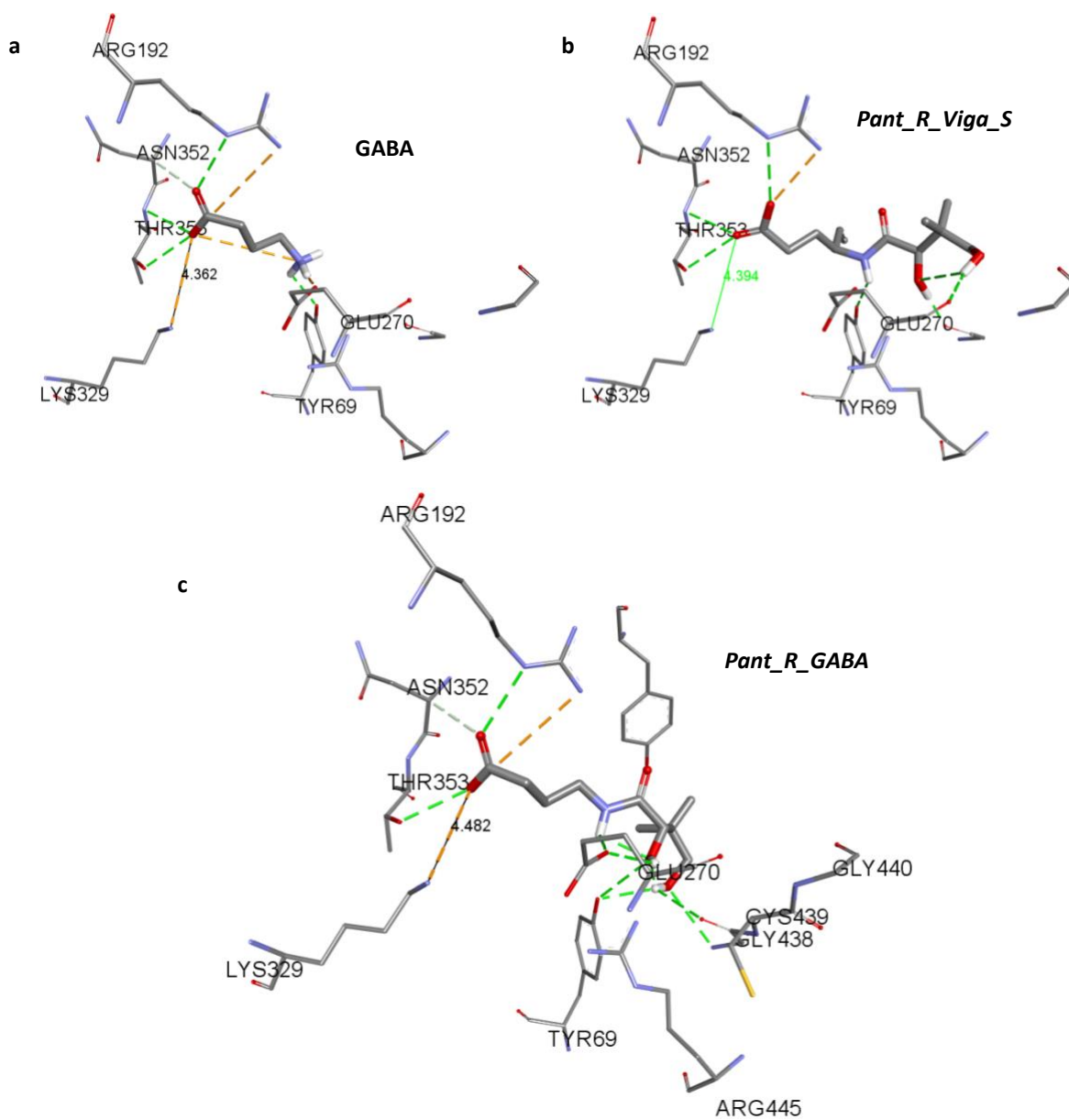


Ilustración 10-3 Representación 3D de las interacciones dadas en el sitio activo catalítico de 10HV para GABA (a) *Pant_R_Viga_S* (b) y *Pant_R_GABA* (c) en el sitio de mayor probabilidad de unión en las simulaciones de *docking* ciego, además de las distancias entre el nitrógeno de la Ly329 y los oxígenos de los diferentes ligandos.

10.3.2 Docking sobre isoforma modelada de *Homo sapiens*

Para la enzima humana modelada de GABA-AT, los resultados de *docking* ciego se muestran en la Tabla 10-4; se puede observar una tendencia similar a la de los ligandos sobre la isoforma de *Sus scrofa* (1OHV), donde la unión a la proteína se mostró más exergónica por parte de la porción acíclica de la pantolactona unida a la estructura tanto de GABA, así como por parte de los enantiómeros de los derivados de vigabatrina, gracias a las contribuciones adicionales al reconocimiento de los electrones Pi y puentes de hidrógeno. De forma adicional, todos los ligandos con la porción acíclica de pantolactona unida a su estructura resultaron ser más exergónicos al acercamiento sobre el sitio de unión mencionado contra los ligandos sin dicha porción en su estructura, y los controles, más VAS. GABA resultó poseer un ΔG muy similar al obtenido con el cristal de *Sus scrofa*. Al igual que la isoforma mencionada, todos los diastereoisómeros de *N*-pantoilVigabatrina (21, 22, 23 y 24) resultaron ser los más exergónicos al reconocimiento.

Ligando	Número	ΔG	pKd	Ligando	Número	ΔG	pKd
<i>pant_S_Viga_S</i>	22	-7.3	-5.4	<i>pant_S_D_Asp</i>	16	-6.3	-4.6
<i>pant_S_Viga_R</i>	24	-7.3	-5.4	<i>pant_S_L_Glu</i>	18	-6.3	-4.6
<i>pant_R_Viga_S</i>	21	-7.1	-5.2	<i>PLC_R</i>	6	-5.5	-4.0
<i>pant_R_Viga_R</i>	23	-7.1	-5.2	VAS	4	-5.4	-4.0
<i>pant_R_GABA</i>	11	-7.0	-5.1	<i>S_VGB</i>	2	-5.3	-3.9
<i>pant_S_GABA</i>	12	-6.9	-5.1	<i>R_VGB</i>	3	-5.3	-3.9
<i>pant_S_D_Glu</i>	20	-6.9	-5.1	<i>PLC_S</i>	5	-5.1	-3.7
<i>pant_S_L_asp</i>	14	-6.8	-5.0	<i>pan_R</i>	7	-4.9	-3.6
<i>pant_R_L_asp</i>	13	-6.6	-4.8	<i>pant_R</i>	9	-4.9	-3.6
<i>pant_R_D_Glu</i>	19	-6.6	-4.8	<i>pant_S</i>	10	-4.9	-3.6
<i>pant_R_D_Asp</i>	15	-6.5	-4.8	<i>pan_S</i>	8	-4.8	-3.5
<i>pant_R_L_Glu</i>	17	-6.4	-4.7	GABA	1	-4.6	-3.4

Tabla 10-4 Resultados de *docking* con *autodock vina* para GABA-AT modelada de *Homo sapiens*. Las letras en negritas resaltan los ligandos con mejores energías y modos de unión.

Después de la selección del sitio de unión más probable para los diferentes ligandos sobre la isoforma de GABA-AT humana, las interacciones resultantes entre los ligandos y la proteína en su sitio de unión más probable se cotejaron con los aminoácidos del sitio activo de la enzima, que se muestra en la Tabla

10-5. En este caso GABA interactuó con Arg220A, Thr318B, Phe217A y Lys357A con un 52.2% de probabilidad de unión a ese sitio.

A diferencia de los resultados del homotetrámero de *Sus scrofa*, los enantiómeros de vigabatrina sí resultaron tener interacciones con los aminoácidos del sitio activo, además de ser más exergónica su unión que la del propio GABA como era de esperarse. Las interacciones de estos ligandos fueron con los aminoácidos Arg220A, Thr381B y Lys357A; estos tuvieron aproximadamente 50% de probabilidad de unión al sitio de la cadena A. Dentro de las interacciones encontradas para estos dos ligandos y GABA, cabe mencionar que los grupos vinilo y el nitrógeno del aminoácido, en el caso de los primeros y para GABA solo el nitrógeno del aminoácido mostraron un área de superficie accesible al disolvente, quedando así más susceptibles a reaccionar en tal sitio (Ilustración 10-4). Además, estos presentaron interacciones por puentes de hidrogeno entre la Arg220 del sitio activo y los oxígenos de los carbonos carbonilos de los tres ligandos expuestos. Además de un puente de sal con la Lys357 mostrada entre el nitrógeno de esta y el oxígeno desprotonado del ácido carboxílico, estas dos últimas observaciones coincidieron con el mecanismo de acción propuesto para estos ligandos.^{2,20}

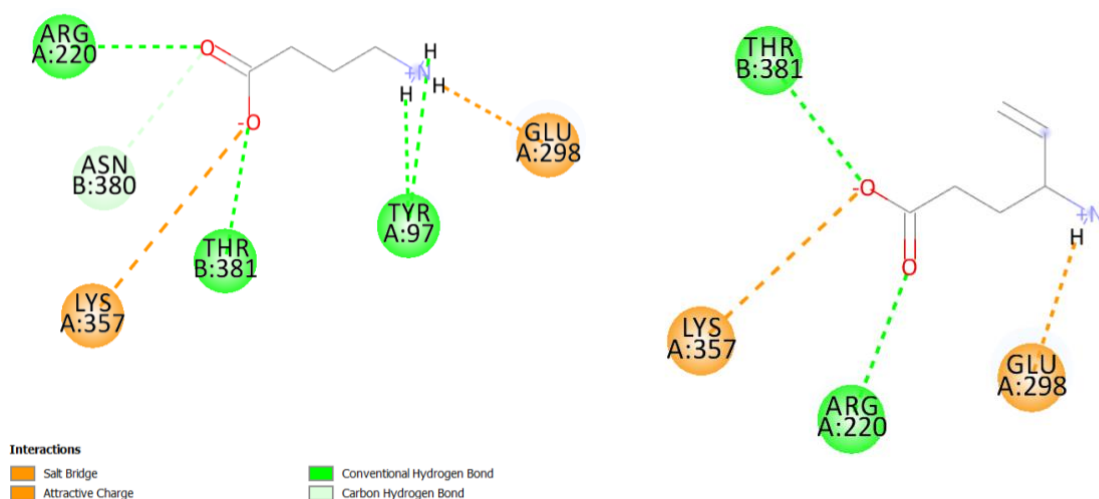


Ilustración 10-4 Interacciones de GABA y (S)-VGB resultantes en el sitio activo con *AutoDock Vina*. El nitrógeno y en el caso de (S)-VGB, los vinilos presentaron un área de superficie accesible al disolvente (mostrado en sombra morada).

Los diastereoisómeros de *N*-pantoilVigabatrina tuvieron un reconocimiento por puente de hidrógeno con el oxígeno del carbono carbonilo del residuo Arg220A y con el hidrógeno del grupo hidroxilo de la Thr381B; solo el ligando **21** tuvo la interacción adicional por puente de hidrogeno con el oxígeno del carbono carbonilo del ácido con la amina de la Lys357A; sin embargo, a diferencia del *N*-pantoilGABA y GABA, esta interacción no fue por puente de sal, mismo fenómeno presentado en el cristal 1OHV. El enantiómero de *N*-pantoilGABA 12, presentó interacciones por puentes de hidrógeno entre los grupos amino de la Arg220A y los oxígenos de los carbonilos de la porción del grupo pantoilo, además del reconocimiento con la Thr381B por puente de hidrógeno con el hidrógeno del grupo hidroxilo del residuo y los oxígenos del grupo carboxilato y la interacción por puente de sal con el oxígeno desprotonado de los grupos carboxilato y amino de la Lys357A, con un 34.6% probabilidad de unión a ese sitio. Cabe mencionar las interacciones de puente de hidrógeno con la parte del grupo pantoilo con los aminoácidos de Gly466, Tyr97 (Ilustración 10-5). Para el diastereoisómeros número **20** de *N*-pantoilglutamato, a pesar de presentar 76% de probabilidad de unión en su sitio más frecuente, no tuvieron interacción con ninguno de los aminoácidos del sitio activo de la enzima. Los diastereoisómeros de *N*-pantoilaspartato no presentaron interacción con aminoácidos del sitio activo al reconocimiento. VAS no presentó interacción alguna en el sitio activo. Para los ligandos **1, 2, 3, 11, 12, 19, 21, 22, 23** y **24** el segundo sitio de unión más frecuente, resultó ser el otro sitio activo de la enzima, que fue el mismo patrón observado en el *docking* de *Sus Scrofa*.²

Ligando	No	Gly 136A	Ser 137A	Arg 192A	Thr 353B	Phe 189A	Lys 329A	% de unión al sitio más probable
<i>GABA</i>	1			✓	✓	✓	✓	52.2
<i>S_VGB</i>	2			✓	✓		✓	42.5
<i>R_VGB</i>	3			✓	✓		✓	56.9
<i>pan_S</i>	8	✓	✓		✓			38.0
<i>pant_R_GABA</i>	11			✓	✓		✓	34.6
<i>pant_S_GABA</i>	12			✓	✓			39.7
<i>pant_R_D_Glu</i>	19			✓				45.7
<i>pant_R_Viga_S</i>	21			✓	✓		✓	47.3
<i>pant_S_Viga_S</i>	22			✓	✓			31.2
<i>pant_R_Viga_R</i>	23			✓	✓			49.2
<i>pant_S_Viga_R</i>	24			✓	✓			39.3

Tabla 10-5 Interacciones entre los aminoácidos del sitio activo de GABA-AT humana modelada y cada ligando. Solo se muestran los ligandos que resultaron con interacciones con aminoácidos del sitio activo como sitio de unión más frecuente de forma más abundante.

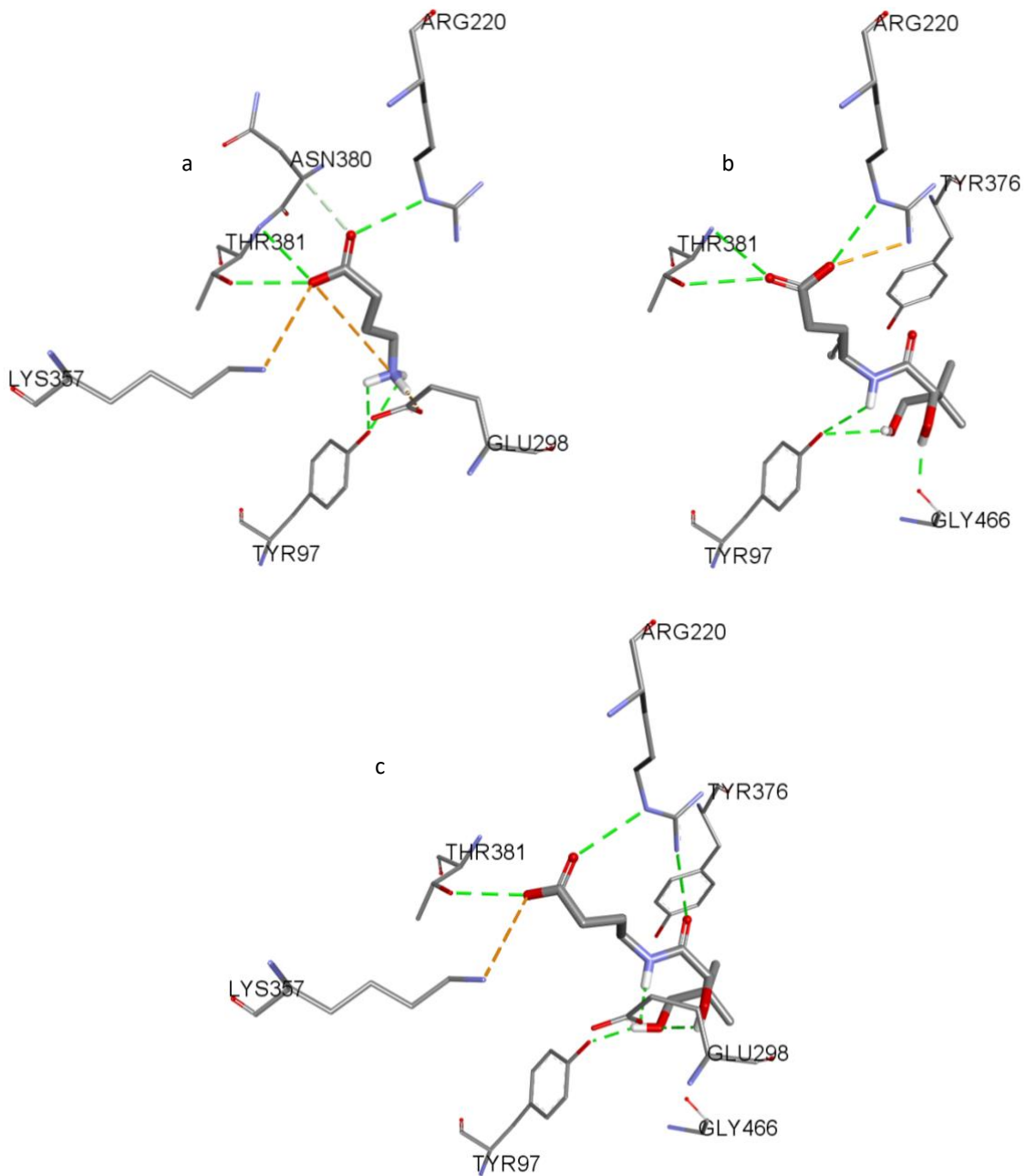


Ilustración 10-5 Representación 3D de las interacciones dadas en el sitio activo catalítico de GABA-AT humana modelada para GABA (a) Pant_S_Viga_S (b) y Pant_R_GABA (c) en el sitio de mayor probabilidad de unión del *docking* ciego.

10.3.3 Docking sobre isoforma de *Pseudomonas fluorescens* modelada

Los resultados de *docking* ciego en la enzima modelada de *Pseudomonas fluorescens* se muestran en la Tabla 10-6. Para esta enzima la tendencia de los ligandos fue parecida a las otras, teniendo de nuevo un aumento en la energía al reconocimiento entre los ligandos y el fragmento del pantoilo presente en su estructura. Dentro de los primeros lugares se encontraron algunos de los diastereoisómeros de *N*-pantoilaspártato y *N*-pantoilglutamato, esto difiriendo un poco de las enzimas anteriores ya que, en estas, las moléculas más exergónicas al reconocimiento fueron los diastereoisómeros de la *N*-pantoilVigabatrina.

Ligando	No.	ΔG	pKd	% de unión al sitio más probable	Ligando	No.	ΔG	pKd	% de unión al sitio más probable
pant_S_D_Glu	20	-7.0	-5.1	35.9	pant_R_D_Asp	15	-6.6	-4.8	71.4
pant_R_Viga_S	21	-7.0	-5.1	49.8	pant_S_Viga_R	24	-6.6	-4.8	40.3
pant_R_L_asp	13	-6.9	-5.1	91.8	pant_S_GABA	12	-6.5	-4.8	32.6
pant_S_L_asp	14	-6.9	-5.1	92.4	VAS	4	-5.4	-4.0	29.5
pant_S_D_Asp	16	-6.9	-5.1	86.1	pant_R	9	-5.2	-3.8	64.3
pant_R_L_Glu	17	-6.9	-5.1	86.3	pant_S	10	-5.2	-3.8	64.8
pant_R_D_Glu	19	-6.9	-5.1	63.5	PLC_S	5	-5.1	-3.7	100.0
pant_R_Viga_R	23	-6.9	-5.1	35.4	pan_R	7	-5.1	-3.7	55.0
pant_S_Viga_S	22	-6.8	-5.0	68.8	PLC_R	6	-5.0	-3.7	82.0
pant_S_L_Glu	18	-6.7	-4.9	26.3	pan_S	8	-5.0	-3.7	73.6
pant_R_GABA	11	-6.6	-4.8	25.2	S_VGB	2	-4.9	-3.6	53.7

Tabla 10-6 Resultados de *docking* con *Auto Dock Vina* para GABA-T de la isoforma de *P. fluorescens* modelada.

Durante el análisis en el cotejo de interacciones de los ligandos con algún aminoácido del sitio activo de la enzima, se encontró que solo GABA resultó con interacciones con los residuos de aminoácido Gln80, Tyr139, Arg142, Tyr156 y Lys269 con un 48.7% de probabilidad de unión en ese sitio; ningún otro ligando presentó alguna interacción con estos aminoácidos.

Al final del análisis de los ensayos *in silico* realizados en las tres proteínas, se generó una gráfica con los resultados obtenidos para la energía de unión de las tres isoformas para el *docking* ciego, pudiendo observar de mejor manera que los diastereoisómeros de *N*-pantoilVigabatrina se colocaron dentro de los primeros lugares entre las tres enzimas. Se observó el aumento en la exergonicidad entre los

ligandos diseñados con el fragmento del grupo pantoilo unido a su estructura y los que no la tuvieron para las tres enzimas.

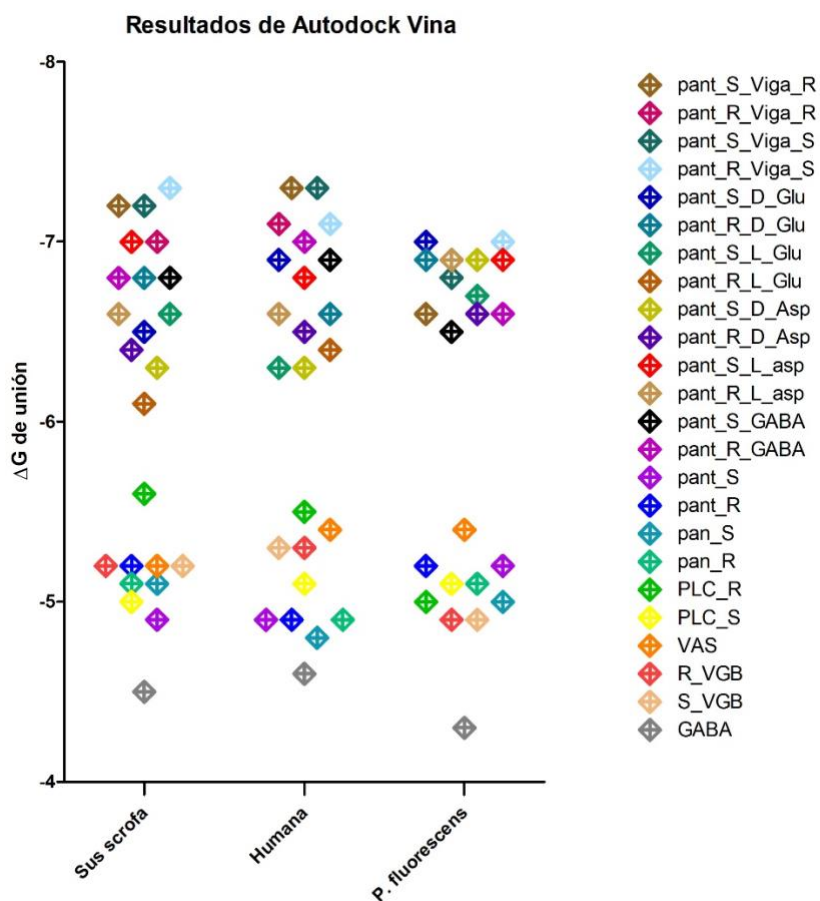


Ilustración 10-6 Comparación de la exergonicidad obtenida de los ensayos in silico de los ligandos propuestos entre las diferentes GABA-AT utilizadas. Se observa en general mejores energías de enlace para aquellos compuestos con la parte acíclica de la pantolactona, así como los diastereoisómeros de *N*-pantoilVigabatrina como los mejores candidatos en general en las tres enzimas.

10.4 Dinámica molecular y *docking* del receptor GABA_A α₁β₂γ₂

Para continuar con el estudio computacional de los ligandos propuestos, se tomó como templete el receptor GABA_A obtenido por Bergmann y colaboradores²⁴ en formato *.pdb modelado a partir de otros receptores filogenéticamente relacionados.²⁴

Se retiraron los ligandos unidos a las diferentes subunidades en el sitio activo de GABA y el sitio alostérico de las benzodiazepinas. El receptor sin los ligandos en

formato *.pdb fue tomado como la conformación al tiempo 0. Tomando en cuenta lo anterior y sin ligando alguno, se cargó el archivo *.pdb en el servidor en línea CHARM GUI⁷⁵ para poder generar los archivos correspondientes y realizar la simulación de dinámica molecular. El receptor fue incrustado en una bicapa lipídica conformada por lípidos característicos de las membranas neuronales⁸¹ (Tabla 10-7). Se presentaron las cargas de los aminoácidos polares frente a los iones potasio y sodio, y se le agregaron 50,000 moléculas de agua al sistema.

Lípido	% en membrana
Ácido propiónico	1.0
Glucolípidos	5.4
Colesterol	16.7
Esteres de colesterol	2.0
Fosfatidiletanolamina	9.6
Ácidos grasos	5.0
Esfingolípidos	10.0
Fosfatidilcolina	17.1
Fosfatidilserina	5.9
Diacilglicerol	5.9
Fosfatidilglicerol	4.2
Fosfatidilinositol	1.7
Triacilgliceroles	15.3

Tabla 10-7 Fracción agregada de los lípidos en la membrana⁸¹ construida para el receptor GABA_A utilizando la plataforma CHARM GUI.

Una vez construido el sistema en una matriz Z, este se llevó al equilibrio y la minimización de su estado de energía en diferentes pasos utilizando el campo de fuerza CHARMM 36 y el software GROMACS.⁷⁶ Una vez obtenido el sistema equilibrado y minimizado en sus cargas, se ejecutó la dinámica a un tiempo de 120 ns. Una vez terminado el cálculo computacional, los archivos fueron analizados con el software VMD⁷⁷ y se tomó como plantilla en formato *.pdb del receptor sin membrana a los tiempos de 60 y 120 ns contando con tres tiempos diferentes para realizar el *docking*. Dichas plantillas fueron evaluadas mediante gráficos de Ramachandran. (Ilustración 10-7).

Cada una de las planillas, a 0, 60 y 120 ns, fueron tratadas con el mismo esquema de *docking* ciego que en las diferentes GABA-AT utilizadas anteriormente, esto solo sobre la porción extra membranal de la isoforma del receptor de GABA_A utilizando el software AutoDock Vina determinando el sitio de unión más probable para cada

uno de los ligandos propuestos en este ensayo complementario al reconocimiento GABAérgico:

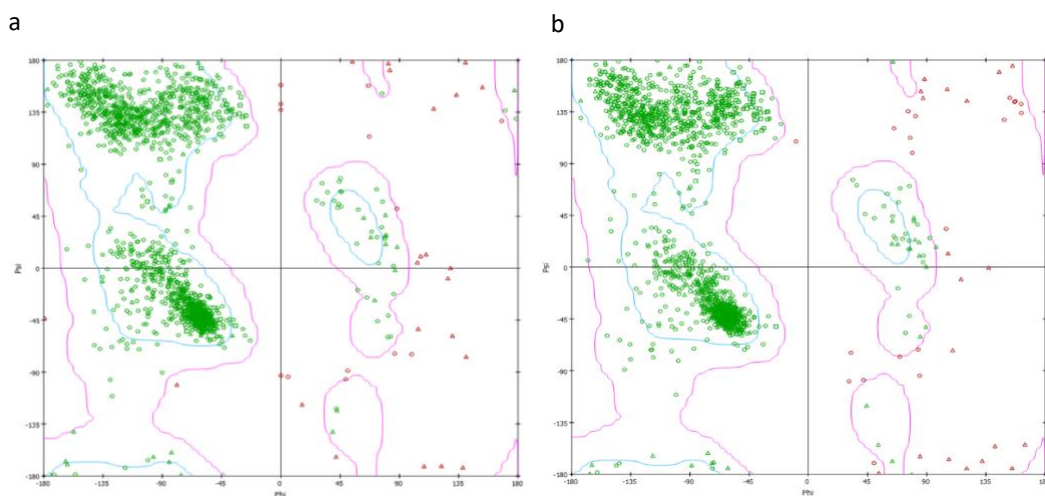


Ilustración 10-7 Gráficos de Ramachandran para la validación de ángulos diedros de las plantillas tomadas a 60 (a) y 120 ns (b) del receptor de GABA_A. Realizado en *Discovery Studio Visualizer*³³

El gráfico de la trayectoria de la dinámica en expresión de RMSD contra el tiempo de los átomos de carbono de la parte proteica del receptor que fue creado utilizando el software VMD⁷⁷ (Ilustración 10-8). Al realizar el análisis de este, se constató que el receptor fue adquiriendo un estado estable en su valor de RMSD conforme las horquillas proteicas del sitio ortostérico de GABA adquirieron una conformación de apertura del sitio (Ilustración 10-9).

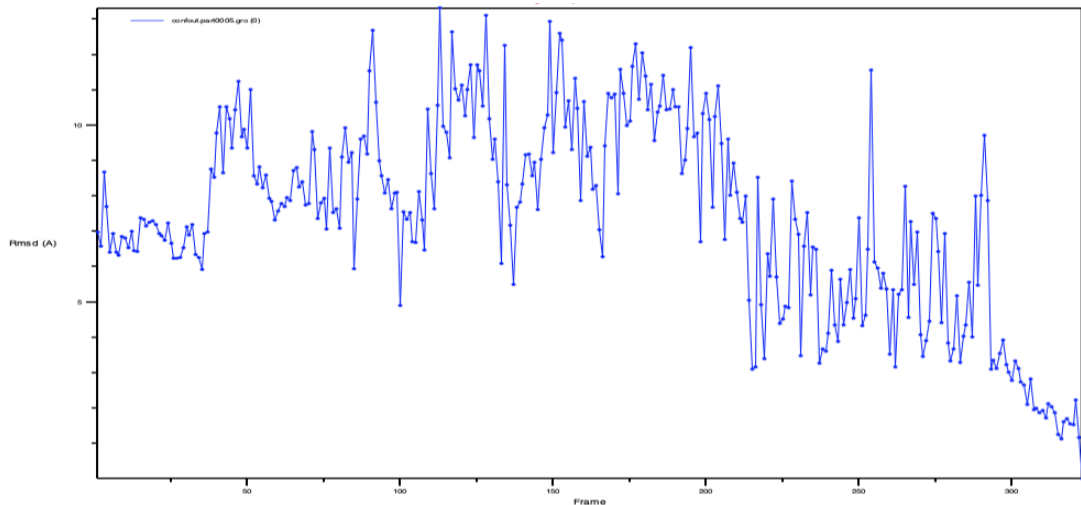


Ilustración 10-8 Trayectoria en forma de RMSD contra el tiempo de los átomos de carbono de la porción proteica del receptor de GABA_A. Se puede observar en general la estabilización del sistema, siendo correspondientes con la apertura de los sitios alostéricos durante la dinámica.

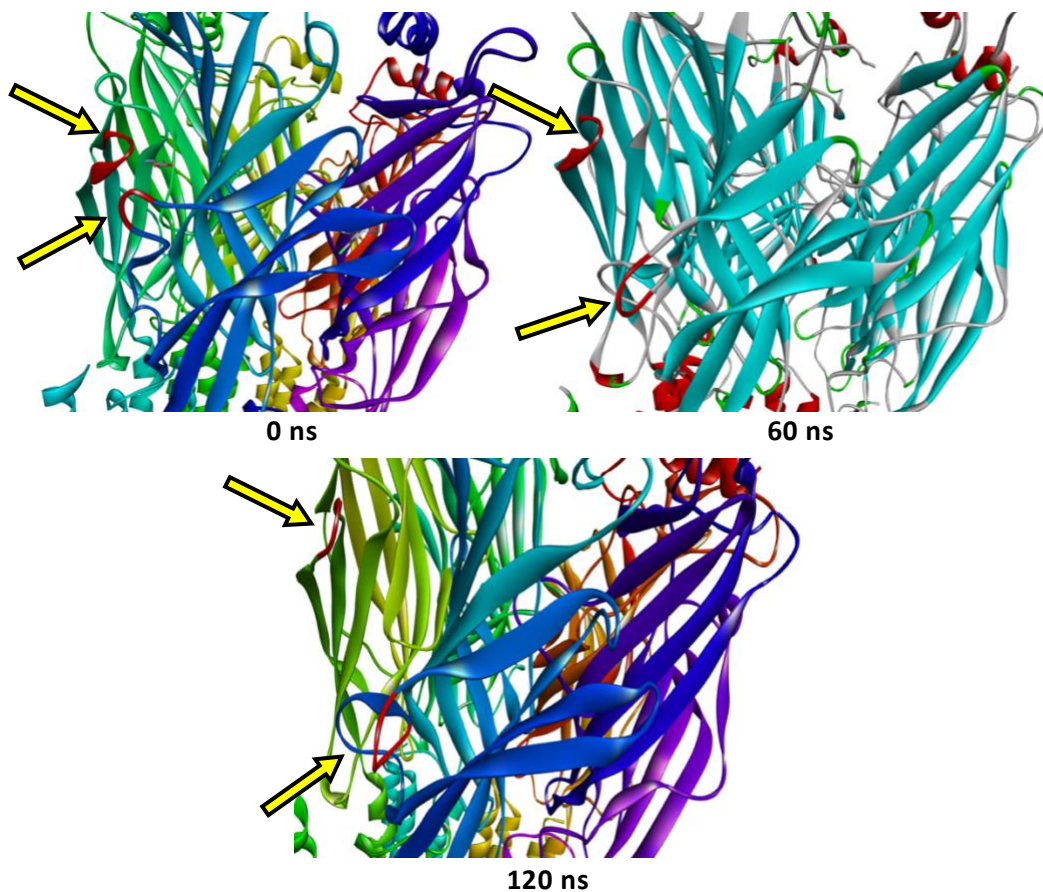


Ilustración 10-9 Apertura de la horquilla del sitio ortostérico conforme al tiempo durante la dinámica molecular. Se puede observar a 0 ns que las horquillas señaladas con las flechas amarillas se encuentran obstruyendo el sitio ortostérico donde se encuentra GABA. Una vez retirado GABA del sitio, la apertura de las horquillas es evidente, esto correlacionado al grafico del RMSD.

10.4.1 Docking a tiempo 0 (T₀)

Para el T₀ (0 ns), al igual que las enzimas GABA-AT se hizo notar un patrón donde los ligandos aumentan su exergonicidad cuando contienen el fragmento pantoilo en su estructura (Tabla 10-8). GABA fue el ligando con un menor valor de exergonicidad, debido a la menor cantidad de grupos sustituyentes en la cadena del aminoácido, diferencia notable con las moléculas propuestas cuyos grupos funcionales sustituyentes de la cadena de la porción del pantoilo refuerzan las interacciones y por lo tanto la exergonicidad al reconocimiento molecular. Sin embargo, al momento de realizar el cotejo de las interacciones entre los ligandos y los aminoácidos de los sitios alostéricos de GABA y de BZD, solo 5 ligandos tuvieron interacción con los aminoácidos del sitio alostérico para BZD (Tabla 10-9). Esto último relacionado posiblemente a que durante el modelamiento de dicho receptor los *Cys-loops* quedaron cerrados ya que contenían a GABA en su sitio ortostérico, el cual fue retirado, quedando cerradas para la entrada de un nuevo ligando.

Ligando	No	ΔG	pKd	Ligando	No	ΔG	pKd
pant_R_D_Asp	15	-7.0	-5.1	pant_R_Viga_S	21	-6.3	-4.6
pant_S_L_Glu	18	-7.0	-5.1	pant_S_GABA	12	-6.2	-4.5
pant_R_L_asp	13	-6.9	-5.1	VAS	4	-6.1	-4.5
pant_S_L_asp	14	-6.8	-5.0	PLC_S	5	-5.8	-4.3
pant_S_D_Glu	20	-6.8	-5.0	pan_R	7	-5.8	-4.3
pant_R_D_Glu	19	-6.7	-4.9	PLC_R	6	-5.7	-4.2
pant_S_Viga_S	22	-6.6	-4.8	pant_R	9	-5.6	-4.1
pant_S_Viga_R	24	-6.6	-4.8	pan_S	8	-5.5	-4.0
pant_R_GABA	11	-6.4	-4.7	pant_S	10	-5.5	-4.0
pant_S_D_Asp	16	-6.4	-4.7	S_VGB	2	-5.3	-3.9
pant_R_L_Glu	17	-6.4	-4.7	R_VGB	3	-5.3	-3.9
pant_R_Viga_R	23	-6.4	-4.7	GABA	1	-4.5	-3.3

Tabla 10-8 Energías al reconocimiento en el ensayo de *docking* ciego con AutoDock Vina para el receptor GABA_A al T₀

A este punto es importante mencionar que los dos sitios activos de GABA en el receptor se mostraron protegidos por unas estructuras conocidas como *Cys-loops*, horquillas conformadas por una cadena de aminoácidos, las cuales se encontraron en estado abierto dejando expuesto el sitio activo a la entrada de GABA y en estado cerrado si este estuvo ocupado y no permitió la entrada de algún otro ligando y como

consecuencia el cambio conformacional para la apertura del canal y el paso consecuente del ion Cl⁻. También cabe mencionar que el receptor de GABA una vez que fue activado y abierto el poro en su totalidad como consecuencia del cambio conformacional y después de que GABA se retiró del sitio activo, y mostró un tiempo de desensibilización.^{24,25}

Ligando	Numero	Tyr 159	Arg 144	Val 202	His 101	Val 211	Tyr 209	Met 130	% de unión al sitio más probable
S_VGB	2	✓					✓		39.7
R_VGB	3	✓					✓		41.2
VAS	4	✓		✓	✓	✓	✓		29.2
pant_R	9	✓							21.3
pant_S	10	✓							21.0

Tabla 10-9 Cotejo de interacciones entre aminoácidos del sitio alostérico de BZD del receptor de GABA_A para 0 ns. Solo se muestran los aminoácidos que resultaron con interacciones con aminoácidos del sitio activo.

10.4.2 Docking a tiempo 60 ns

Para el molde tomado de la dinámica a 60 ns, se observó el mismo patrón que en el anterior, donde la energía de unión de los ligandos propuestos aumentó con la porción acíclica de la pantolactona, teniendo en cuenta que el ligando más exergónico fue el diastereoisómero de *N*-pantoilglutamato **20**, mientras que el más bajo en tal medida, fue el propio GABA que fue el ligando involucrado en la neurotransmisión. Los diastereoisómeros de *N*-pantoilGABA fueron de entre todos los ligandos con la porción acíclica los de menor energía de enlace al reconociendo. (Tabla 10-10)

Ligando	No	ΔG	pKd	Ligando	No	ΔG	pKd
pant_S_D_Glu	20	-7.2	-5.3	pant_R_GABA	11	-6.3	-4.6
pant_S_L_Glu	18	-7.1	-5.2	pant_S_GABA	12	-6.3	-4.6
pant_R_D_Glu	19	-7.1	-5.2	PLC_R	6	-5.4	-4.0
pant_R_D_Asp	15	-6.9	-5.1	pant_R	9	-5.3	-3.9
pant_R_L_asp	13	-6.8	-5.0	pant_S	10	-5.3	-3.9
pant_S_L_asp	14	-6.8	-5.0	PLC_S	5	-5.2	-3.8
pant_R_L_Glu	17	-6.8	-5.0	R_VGB	3	-5.1	-3.7
pant_S_Viga_R	24	-6.8	-5.0	VAS	4	-5.1	-3.7
pant_S_D_Asp	16	-6.7	-4.9	pan_S	8	-5.1	-3.7
pant_R_Viga_S	21	-6.7	-4.9	S_VGB	2	-5.0	-3.7
pant_S_Viga_S	22	-6.6	-4.8	pan_R	7	-5.0	-3.7
pant_R_Viga_R	23	-6.6	-4.8	GABA	1	-4.3	-3.2

Tabla 10-10 Energías al reconocimiento en el ensayo de *docking* ciego con *AutoDock Vina* para el receptor GABA_A a 60 ns. No se observa un patrón correspondiente con los resultados en el T₀. Los ligandos con mayor exergonicidad fueron los de glutamato, mientras que para T₀ fueron los de Aspartato y glutamato.

Al realizar el análisis de las interacciones, se encontró que las moléculas con el fragmento pantoilo mostraron mayor probabilidad de unión al sitio ortostérico del receptor de GABA_A y resultaron con interacciones con los aminoácidos del sitio alostérico, a excepción del diastereoisómero de *N*-pantoilaspartato **15**, sin embargo, el sitio de unión de mayor frecuencia para GABA no resultó ser el sitio ortostérico, por lo que no se observaron interacciones de este con los aminoácidos del sitio activo. El sitio de unión más probable para (*S*)-VGB resultó ser el sitio ortostérico de GABA, teniendo interacciones con ARG66 y TYR205. Cabe mencionar que el enantiómero *S* de vigabatrina es el farmacológicamente activo. También VAS resultó tener interacciones en el sitio ortostérico de GABA. Solo el ligando **15** tuvo como mayor probabilidad de unión el sitio alostérico de BZD.

Ligando	Numero	THR 129	ARG 66	THR 202	TYR 157	GLU 155	TYR 205	% de unión al sitio más probable
S_VGB	2		✓				✓	80.7
VAS	4				✓		✓	68.8
pant_R_GABA	11	✓	✓			✓		48.0
pant_S_GABA	12		✓					47.4
pant_R_L_asp	13		✓	✓		✓	✓	31.6
pant_S_L_asp	14		✓			✓		68.5
pant_S_D_Asp	16		✓					67.6
pant_R_L_Glu	17		✓	✓		✓	✓	67.8
pant_S_L_Glu	18		✓	✓		✓	✓	59.1
pant_R_D_Glu	19		✓	✓		✓	✓	49.5
pant_S_D_Glu	20		✓	✓		✓	✓	52.1
pant_R_Viga_S	21	✓	✓					40.9
pant_S_Viga_S	22		✓	✓		✓	✓	36.6
pant_R_Viga_R	23		✓					48.2
pant_S_Viga_R	24	✓	✓			✓		53.9

Tabla 10-11 Cotejo de interacciones entre aminoácidos del sitio ortostérico de GABA en el receptor de GABA_A a 60 ns. Solo se muestran los ligandos que resultaron con interacciones con algunos aminoácidos del sitio activo.

10.4.3 Docking a tiempo 120 ns

Por último, a los 120 ns se observó el mismo patrón, donde las moléculas con el fragmento pantoilo resultaron con más energía de unión, siendo el diastereoisómero de *N*-pantoilglutamato **19** con mayor energía de enlace y el diastereoisómero de *N*-pantoilGABA **11** el de menor energía de entre estos ligandos. Nuevamente GABA resultó el ligando con menor energía de enlace. (Tabla 10-12).

Ligando	No	ΔG	pKd	Ligando	No	ΔG	pKd
pant_R_D_Glu	19	-7	-5.1	pant_S_L_asp	14	-6.3	-4.6
pant_R_L_asp	13	-6.9	-5.1	pant_R_GABA	11	-6.2	-4.5
pant_R_D_Asp	15	-6.8	-5.0	PLC_R	6	-5.6	-4.1
pant_S_D_Glu	20	-6.8	-5.0	PLC_S	5	-5.5	-4.0
pant_S_Viga_S	22	-6.8	-5.0	VAS	4	-5.4	-4.0
pant_S_L_Glu	18	-6.7	-4.9	pan_S	8	-5.4	-4.0
pant_S_D_Asp	16	-6.6	-4.8	pant_R	9	-5.4	-4.0
pant_R_L_Glu	17	-6.6	-4.8	pant_S	10	-5.4	-4.0
pant_R_Viga_R	23	-6.6	-4.8	pan_R	7	-5.2	-3.8
pant_S_Viga_R	24	-6.5	-4.8	S_VGB	2	-5.1	-3.7
pant_R_Viga_S	21	-6.4	-4.7	R_VGB	3	-5.1	-3.7
pant_S_GABA	12	-6.3	-4.6	GABA	1	-4.5	-3.3

Tabla 10-12 Energías al reconocimiento en el ensayo de *docking* ciego con *AutoDock Vina* para el receptor GABA_A a 120 ns.

Del análisis de los sitios de unión más probables para cada uno de los ligandos, solo los ligandos **15**, **17**, **18**, **21**, **23** y **24** resultaron tener interacciones con los aminoácidos del sitio ortostérico de GABA. Los ligandos con el fragmento pantoilo **12**, **18**, **21** y **24** no mostraron interacciones con aminoácidos del sitio alostérico ni ortostérico. El diasteroímero **15** tuvo la mayor probabilidad de unión en el sitio ortostérico, mientras que los diastereoisómeros de *N*-pantoilVigabatrina **21**, **23** y **24** tienen una menor probabilidad, sin embargo, estos últimos son los que se mantuvieron constantes en ese sitio de unión en el *docking* a 60 ns y 120 ns. Por otro lado, solo los diastereoisómeros con la porción acíclica de pantolactona **13**, **15** y **19** resultaron con interacciones del sitio alostérico de benzodiazepinas (no mostrados en la tabla) (Tabla 10-13).

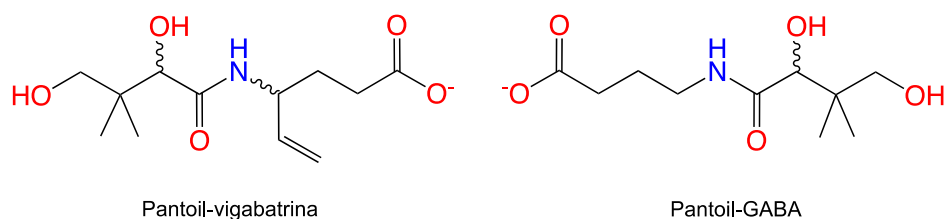
Ligando	Numero	ARG 66	THR 202	GLU 155	TYR 205	% de unión al sitio más probable
pant_R_D_Asp	15	✓	✓		✓	69.6
pant_R_L_Glu	17	✓	✓		✓	70.8
pant_S_L_Glu	18	✓			✓	37.1
pant_R_Viga_S	21	✓	✓		✓	30.9
pant_R_Viga_R	23	✓		✓		23.2
pant_S_Viga_R	24	✓				24.5

Tabla 10-13 Cotejo de las interacciones entre aminoácidos del sitio alostérico de GABA del receptor de GABA_A para 120 ns. Solo se muestran los ligandos que resultaron con interacciones con aminoácidos al sitio activo.

10.5 Análisis de resultados de las simulaciones moleculares

Derivado de los resultados anteriores, se pudo constatar que los ligandos propuestos con la porción acíclica de pantolactona presentaron un mayor número de interacciones y modos de unión favorables hacia las diferentes proteínas utilizadas en esta serie de ensayos. Para los diferentes estereoisómeros propuestos, se observó en general con los diferentes blancos aquí utilizados, una mejor interacción por parte de la serie de *N*-pantoilVigabatrina. Mientras que para los diastereoisómeros de *N*-pantoilaspartato, a pesar de resultar con mayor exergonicidad en algunos casos, la tendencia de unión de estos no se encontró el sitio activo ni ortostérico de los blancos utilizados. A partir de esto se planteó la posterior síntesis y caracterización de análogos de GABA: *N*-pantoilGABA y *N*-

pantoilVigabatrina, con la finalidad de realizar los ensayos *in vivo* y verificar la correlación de estos candidatos con lo realizado *in silico* (Esquema 10-1).



Esquema 10-1 Estereoisómeros de los ligandos seleccionados para ensayos *in vivo* con base en las evaluaciones *in silico*.

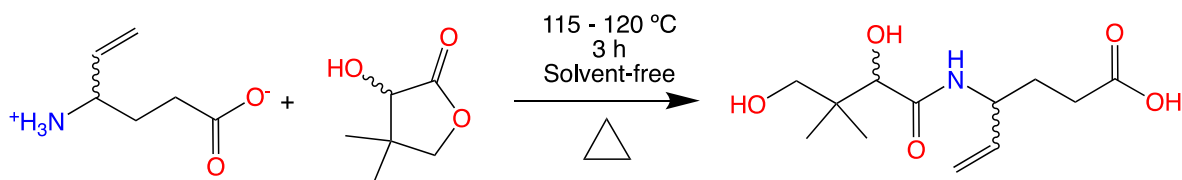
11 Síntesis y caracterización de pantoil-derivados

Para las síntesis de los ligandos propuestos, se utilizó como materia prima la mezcla racémica (*R*, *S*) de pantolactona comercial, ya que esta es la opción menos costosa para establecer las mejores condiciones de reacción y rendimientos favorables; el reactivo enantiopuro es más costoso por lo que se reservó para en primera instancia, probar con la mezcla. Los productos fueron caracterizados por espectroscopia de resonancia magnética nuclear realizada en un OXFORD/VARIAN Mercury NMR 300 MHz para experimentos ^1H y 75 MHz para ^{13}C , utilizando cloroformo deuterado para la muestra de *N*-pantoilVigabatrina y dimetilsulfóxido deuterado para el caso de *N*-pantoilGABA. El tetrametilsilano sirvió como referencia interna para los cambios químicos.

11.1 Síntesis y caracterización de *N*-pantoilVigabatrina

Para la síntesis de la mezcla racémica de *N*-pantoilVigabatrina, la vigabatrina necesaria como materia prima para síntesis y control farmacológico se obtuvo de las tabletas de marca comercial Sabril® de los laboratorios SANDOZ.

La extracción se realizó de acuerdo en el anexo empleando el punto de fusión (171–176 °C) reportado en pubchem⁸² como criterio de pureza para su uso en síntesis.



Esquema 11-1 Reacción de obtención de los diastereoisómeros de *N*-pantoilVigabatrina vía apertura de la pantolactona.

Posteriormente una cantidad equimolar de mezcla racémica de pantolactona con la de vigabatrina fue llevada a calentamiento a 130 – 140 °C durante 1.5 horas. El residuo aceitoso de aspecto negruzco se destiló en el equipo Kugelrohr, el cual es un equipo cuyo propósito es la destilación de pequeñas cantidades de ligandos con alto punto de ebullición y a presiones muy bajas, a una temperatura de 115 °C y una presión de 1 mmHg (para este caso) de donde se obtuvieron 2.6 g (81.5 %, 10.02 mmol) de producto líquido incoloro de *N*-pantoilVigabatrina. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 1.05 (s, 3H, 3'a) 1.18 (m, $J=1.1$ Hz, 3H, 3'b) 1.88 – 1.73 (m, 1H, 3), 2.40 – 2.22 (m, 3H, 2 y 3), 4.02 – 3.88 (m, 2H, 9), 4.10 (s, 1H, 7), 4.16 (tt, $J = 6.2, 1.1$ Hz, 1H, 4), 4.61 (s, 1H, 10), 5.27 – 5.05 (m, 2H, 4b), 5.77 (dd, $J = 10.2, 6.7$ Hz, 1H, 4a), 6.77 (s, 1H, 5) ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 18.97 - CH_3 (3'b), 22.97 - CH_3 (3'a), 27.97 - CH - (3), 30.02 - CH - (2), 40.82 - C - (3'), 56.96 - CH - (4), 75.70 - CH_2 - (4'), 76.52 - CH - (2'), 115.83 = CH_2 (6), 138.56 - $\text{CH} =$ (5), 178.14 - NCO - (1'), 179.16 - COO (1).

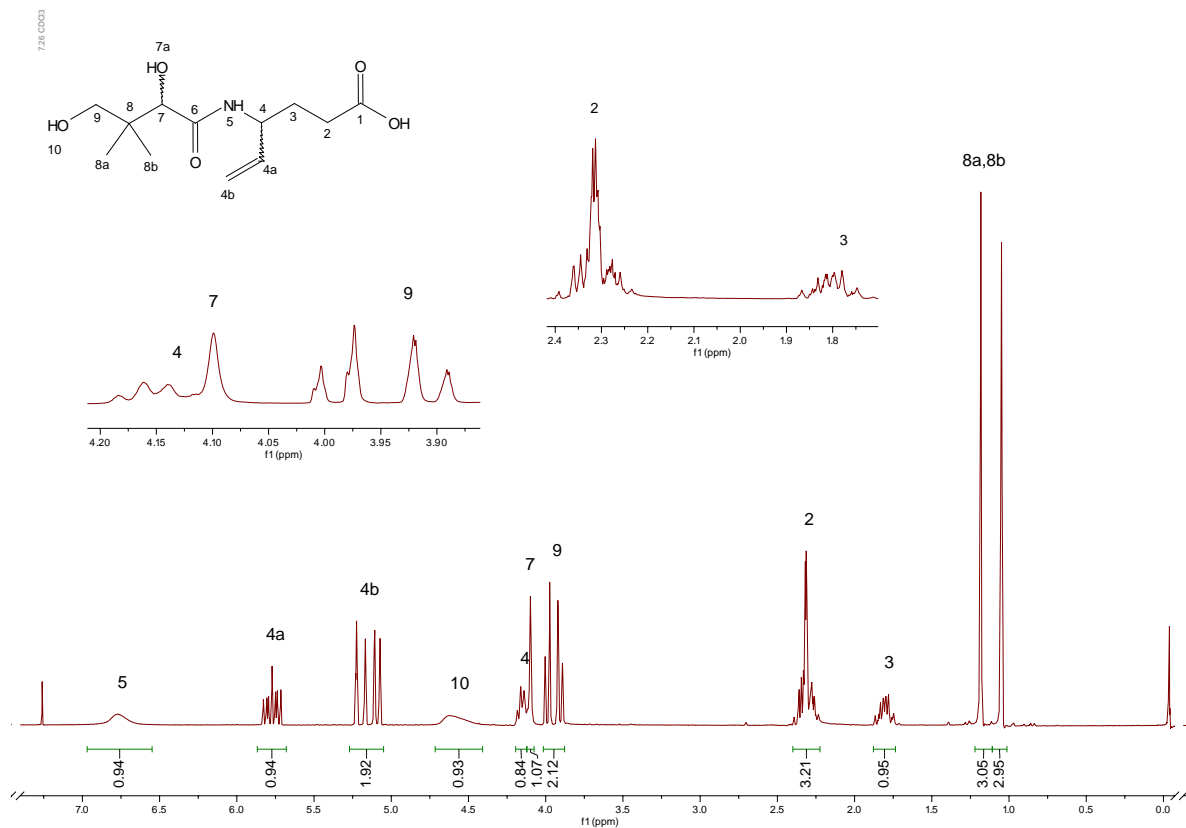


Ilustración 11-1. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de *N*-pantoiVigabatrina.

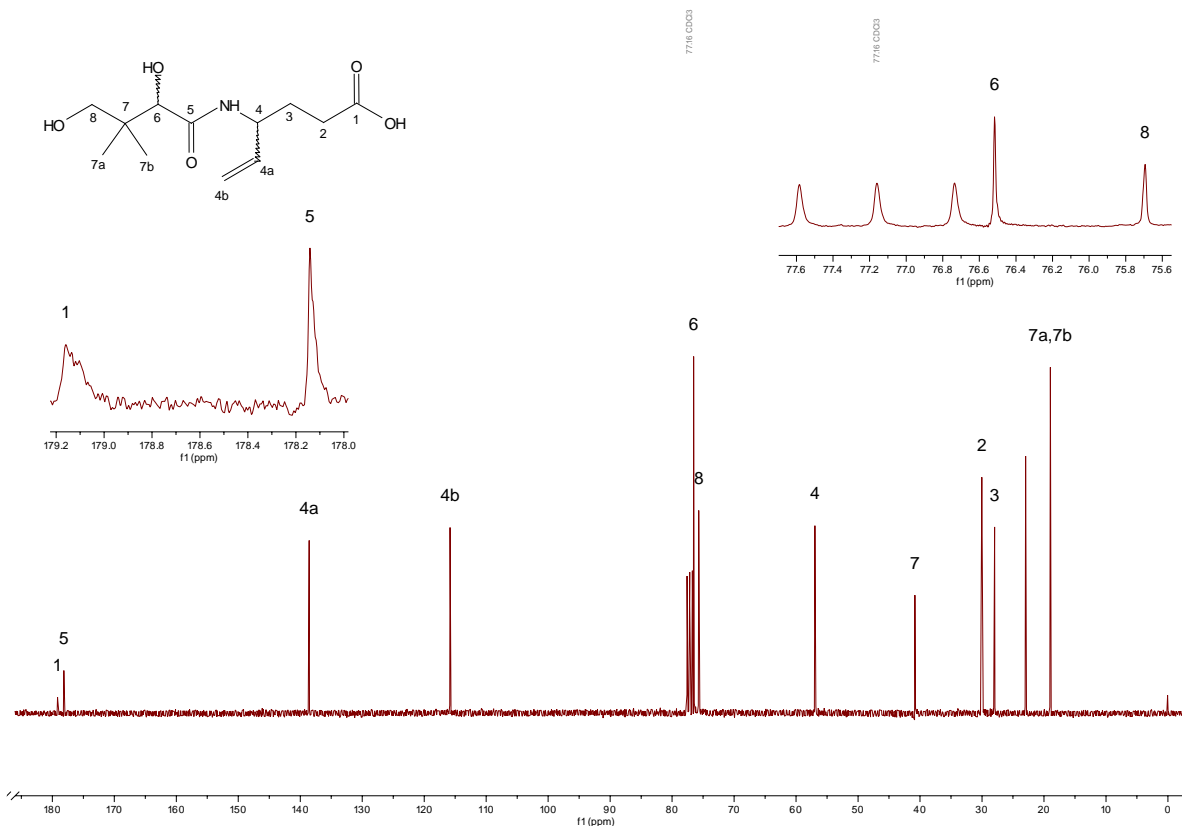
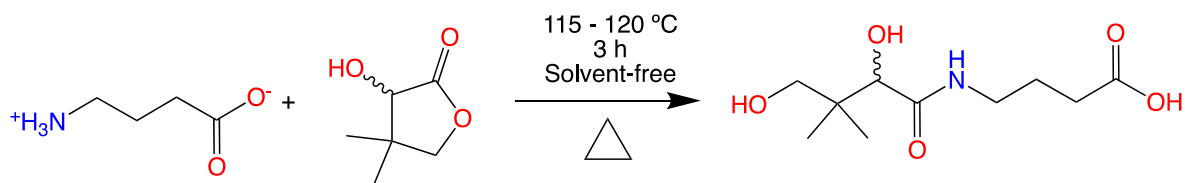


Ilustración 11-2 RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de *N*-pantoilVigabatrina.

11.2 Síntesis y caracterización de *N*-pantoilGABA

En el caso de la mezcla de diastereoisómeros de *N*-pantoilGABA, esta se preparó de la siguiente manera: Una mezcla equimolar de pantolactona racémica y GABA fue llevada a 165-170 °C durante una hora; el residuo aceitoso se destiló en el equipo Kugelrohr a 110° C a una presión de 1 mmHg de donde se obtuvieron 2.74 g (80.26%) de producto líquido aceitoso incoloro. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 0.89 (s, 3H, 3'a), 1.06 (s, 3H, 3'b), 2.01 – 1.90 (*m*, 2H, 3), 2.10 – 2.03 (*m*, 2H, 2), 3.20 (*ddt*, $J = 7.2, 6.4, 0.7$ Hz, 2H, 4), 3.41 (s, 2H, 10), 3.92 (*d*, $J = 0.8$ Hz, 2H, 9), 4.08 (*d*, $J = 6.1$ Hz, 1H, 7), 5.96 (*d*, $J = 6.1$ Hz, 1H, 7a), 7.51 (s, 1H, 5). ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 19.00 - CH_3 (3'b), 20.51 - CH_3 (3'a), 22.30 - CH- (3), 30.02 - CH- (2), 40.34 - CH- (4), 41.50 - C- (7), 74.58 - CH_2- (8), 75.06 - CH- (6), 177.00 - NCO- (5), 177.44 - COO (1).



Esquema 11-2 Reacción de formación de los diastereoisómeros de *N*-pantoilGABA.

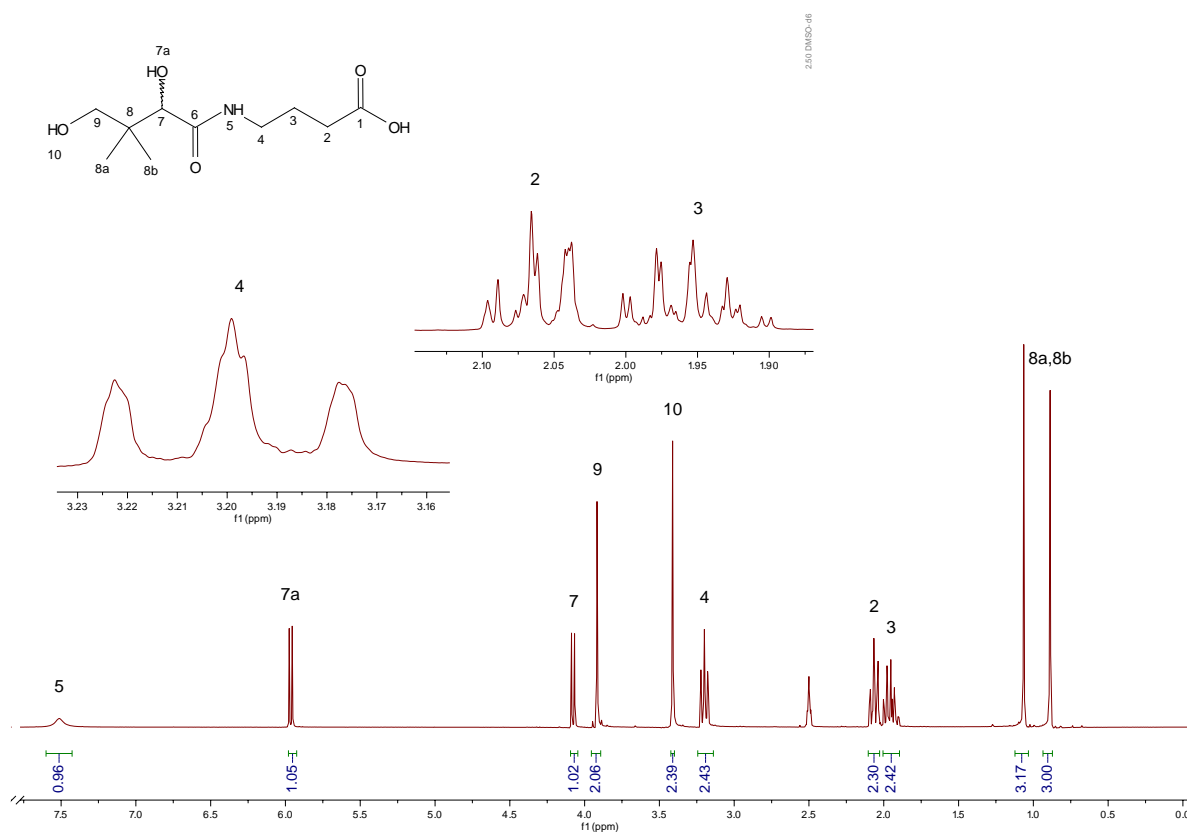
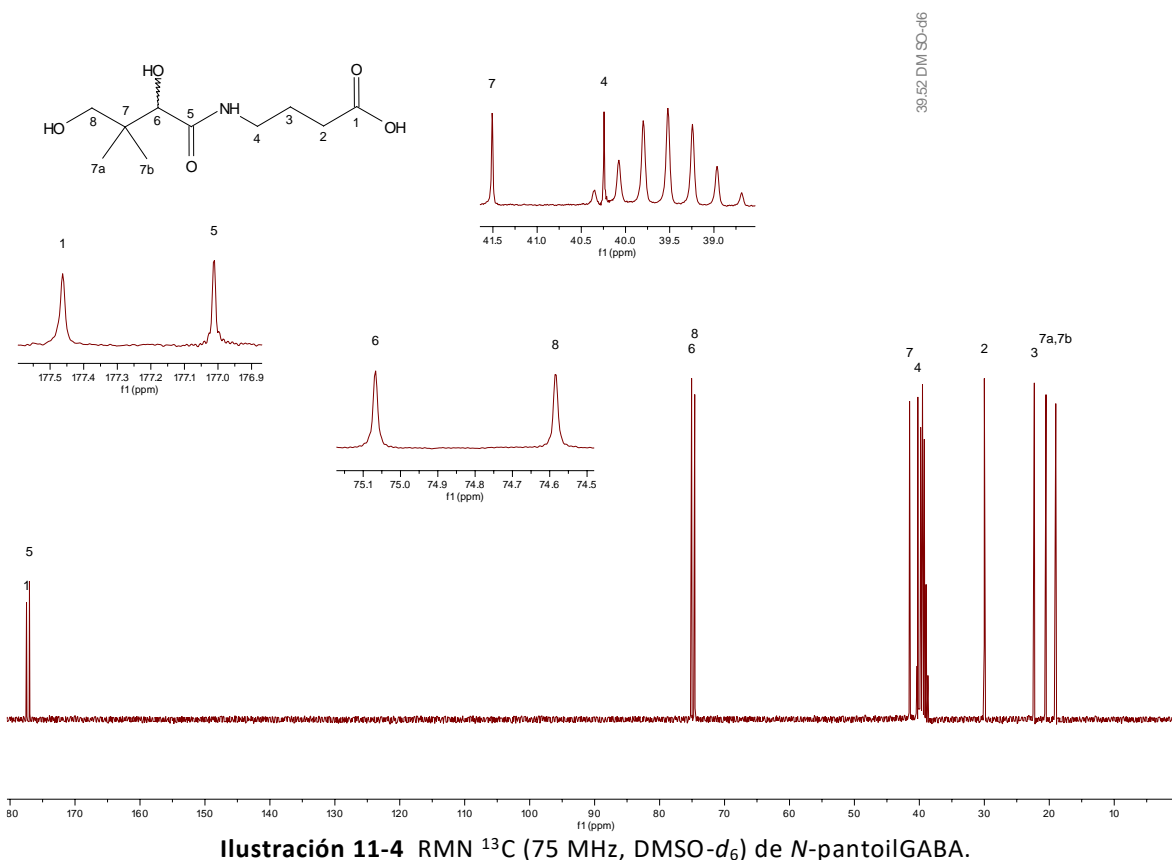


Ilustración 11-3 RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) de *N*-pantoilGABA.



12 Evaluaciones *in vivo*

12.1 Determinación de la DL_{50}

Para la determinación de la dosis letal media (DL_{50}) de cada una de las mezclas de diastereoisómeros sintetizados se utilizó el método descrito por el profesor Dietrich Lorke.⁷⁸ En una primera etapa se estratificaron tres grupos con una $n=3$ cada uno. A cada uno de los grupos se le administró una dosis de 10, 100 y 1,000 mg/Kg respectivamente. Se llevó a cabo la observación continua durante 4 horas posteriores a la administración más el cuidado y registro de los pesos en las dos semanas posteriores. En caso de registrarse alguna muerte dentro de alguno de los grupos se realizó la interpolación en las dosis correspondientes con grupos de $n=3$ para la búsqueda más detallada del dato de la DL_{50} , en cambio si no se observaba el registro de muerte alguna en ninguno de los grupos no se realizó la extrapolación y se reportó una DL_{50} por encima de 1,000 mg/Kg; no se exploraron rangos mayores

debido a que para este enfoque, mayores dosis no representan interés farmacológico. Durante el tiempo de observación se hizo el registro de la manifestación de los signos de toxicidad (piloerección, cambio de aspecto de membranas o mucosas; temblores, convulsiones, salivación excesiva, diarrea, letargia, somnolencia prolongados o coma entre otros). A los ratones sobrevivientes a la dosis administrada posterior a las 4 horas de observación continua, se les dió un seguimiento durante 14 días en los cuales cada día se registraron los pesos para verificar la existencia de una variación en el mismo contra el crecimiento, que posiblemente pudo estar relacionada con la toxicidad de la mezcla racémica administrada.

12.1.1 Toxicidad de la mezcla de *N*-pantoilVigabatrina

Durante la primera fase del ensayo, se administraron dosis crecientes en forma logarítmica progresiva, teniendo tres grupos de 10, 100 y 1,000 mg/Kg. Para el grupo de dosis de 10 mg/Kg durante la observación inmediata a la administración no se observaron síntomas algunos relacionados a la toxicidad. En el caso de la siguiente dosis, se observaron signos de sedación, probablemente relacionados a la mezcla administrada. En el último grupo (1,000 mg/Kg), se observaron las manifestaciones aproximadamente a los primeros 5 minutos posteriores a la administración, convulsiones del tipo tónico-clónicas e inmediatamente la muerte. Considerando las observaciones anteriores, se realizó la interpolación de los resultados considerando las dosis de las progresiones logarítmicas, de 2.5 (316.2 mg/Kg) 2.6 (398.11mg/Kg) y 2.7 (501.18 mg/Kg), encontrando una **DL₅₀ de 401.63 mg/Kg.**

Para la primera dosis de esta segunda fase (316.2 mg/Kg), se observó un efecto sedante marcado en los ratones durante las primeras 4 horas de observación, además un comportamiento de forma gradual que parecía ser un reflejo de náusea. En el caso de la segunda dosis en la escala propuesta (398.11 mg/Kg), los ratones presentaron el reflejo nauseoso de forma inmediata. Además, en todos fue evidente la piloerección y algunos espasmos dando la impresión de un estado preconvulsivo. Posterior a eso, dos ratones presentaron sedación sin la pérdida de lo que parecía

un reflejo nauseoso como fue mencionado anteriormente. Uno de ellos presentó convulsiones del tipo tónico-clónicas, una hora posterior a la administración e inmediatamente la muerte. Para la tercera dosis (501.18 mg/Kg), aproximadamente 5 minutos después de la administración los ratones comenzaron con convulsiones del tipo tónico-clónicas, estas menos intensas que las observadas en la dosis de 1,000 mg/Kg y en un tiempo no inmediato a la administración. Además, la muerte sobrevino en un tiempo más prolongado.

Primera fase		Segunda fase	
Dosis (mg/Kg)	Mortalidad	Dosis (mg/Kg)	Mortalidad
10	0/3	316.2	0/3
100	0/3	398.1	1/3
1000	3/3	501.2	3/3

Tabla 12-1 Registro de la primera y segunda fase de la determinación de la DL₅₀ para la mezcla de *N*-pantoiilVigabatrina

Para el caso de los grupos de las dosis de 10 y 100 mg/Kg se realizó el seguimiento durante 7 días del peso de los ratones para verificar si se mostraron otras manifestaciones de toxicidad aguda, para lo que se observó el incremento de peso en los días posteriores, asociado a un crecimiento normal de los ratones.

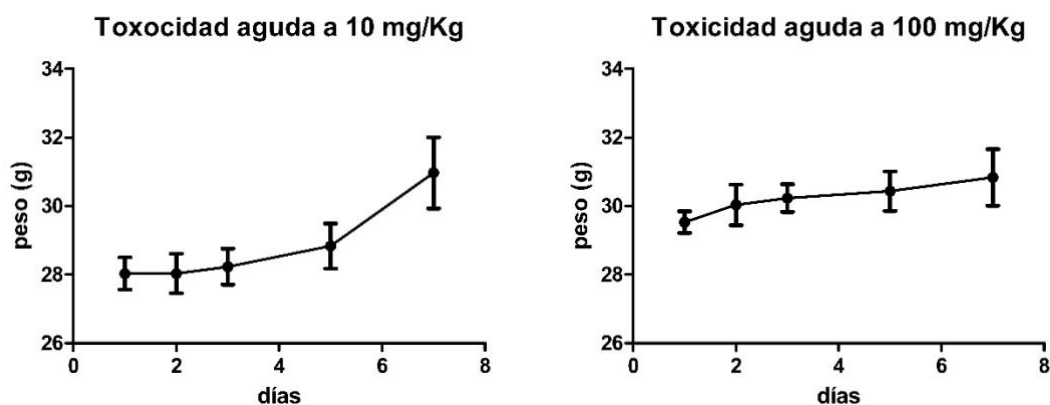


Ilustración 12-1 Gráficos de registro del peso de los animales de experimentación a las dosis de 10 y 100 mg/Kg desde el día de la administración de la mezcla de diastereoisómeros de *N*-pantoiilVigabatrina. Se observa una tendencia de ganancia de peso durante los días posteriores a la administración de la mezcla indicando que no se afectó el crecimiento de estos.

Para el caso de la dosis de 316.23 mg/Kg, se realizó el registro del peso al siguiente día de la administración observándose una disminución del peso de forma

considerable; pelo erizado y un mal estado en general de los ratones (sin respuesta a estímulo por parte del observador y sin movimientos elusivos a una correcta respuesta). Se registró la muerte de los especímenes al tercer día como consecuencia del deterioro del estado físico de los ratones.

En el grupo de la dosis de 398.11 mg/Kg, los dos ratones sobrevivientes a las primeras cuatro horas de observación directa, murieron al día inmediato a la administración.

12.1.2 Toxicidad de la mezcla de *N*-pantoilGABA

La mezcla de *N*-pantoilGABA se puso a prueba en la primera fase del ensayo, determinando que en ninguna de las dosis se presentó algún efecto relacionado a la toxicidad aguda durante las 4 primeras horas posteriores a la administración. No se observó efecto sedante o dato alguno de toxicidad como alguna muerte en alguno de los tres grupos (Tabla 12-2).

Primera fase	
Dosis (mg/Kg)	Mortalidad
10	0/3
100	0/3
1,000	0/3

Tabla 12-2 Registro de la primera fase de la determinación de la DL₅₀ para la mezcla de *N*-pantoilGABA

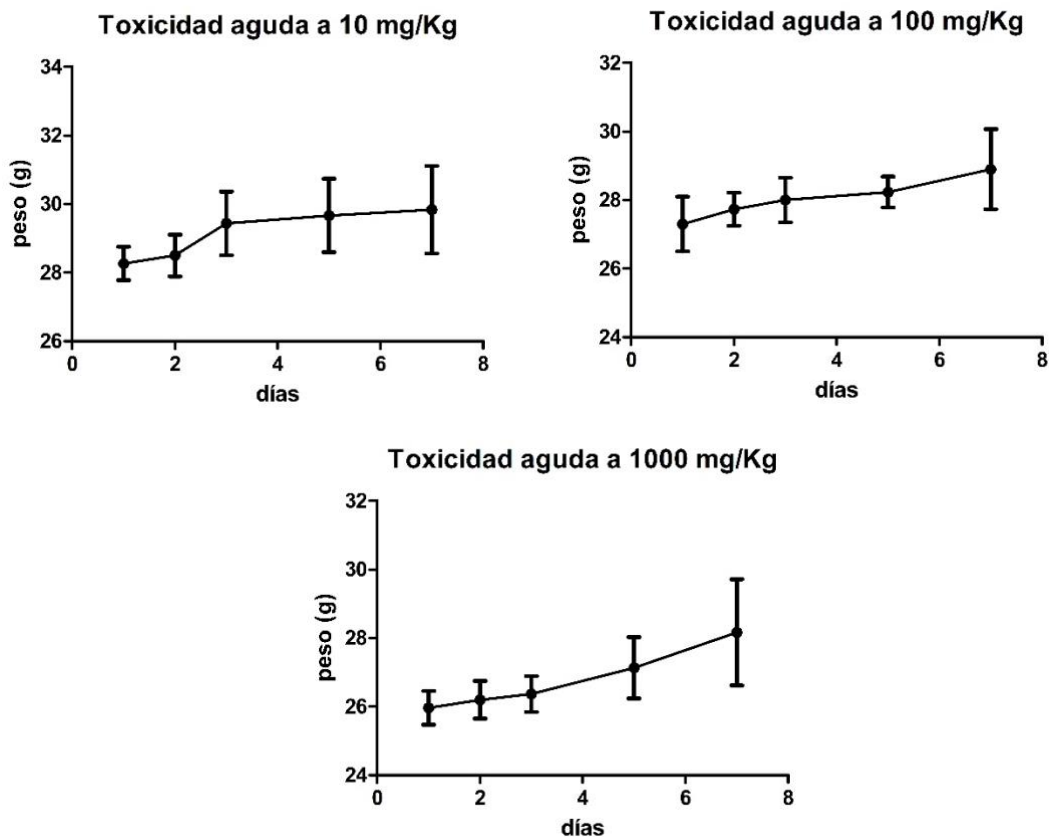


Ilustración 12-2 Gráficos de registro del peso de los animales en las dosis de 10, 100 y 1,000 mg/Kg desde el día de la administración de la mezcla racémica de *N*-pantoilGABA. En todas las dosis se observa la tendencia al incremento del peso de los ratones durante los días de observación.

Se realizó el seguimiento del peso de los animales durante 7 días posteriores a las 4 horas de observación después de la administración, observándose ningún efecto sobre la ganancia de peso de los animales. Debido a que no se presentó efecto alguno de toxicidad aguda en el grupo de 1,000 mg/Kg de peso, se decidió no realizar la extrapolación de las dosis, quedando reportado que la **DL₅₀** se encuentra por encima de 1,000 mg/Kg de peso. Esto último coincidiendo con algunos reportes de la literatura.^{83,84}

12.2 Determinación de la actividad anticonvulsivante de los ligandos propuestos

Las mezclas racémicas sintetizadas de los ligandos elegidos con base en los resultados *in silico*, fueron puestas a prueba para determinar su actividad anticonvulsivante mediante el modelo de crisis convulsivas inducidas por PTZ (pentilentetrazol). Las dosis para la inducción de crisis convulsivas con PTZ vía

subcutánea que varía de 70 a 120 mg/Kg en ratones⁸⁵, por lo que se tomó la media de esos dos valores, 95 mg/Kg vía subcutánea. Se tomó en cuenta el tiempo de latencia transcurrido desde la administración subcutánea del PTZ hasta la aparición de la primera crisis convulsiva generalizada tónico-clónica, el número de crisis generalizadas tónico-clónicas presentadas y la muerte del ratón. Se tomó como fármaco de referencia al valproato sódico y a la vigabatrina, esta última debido a que es el único fármaco inhibidor de la GABA-AT que se encuentra a la venta en el mercado⁴⁶. Para el primero se administró una dosis de 1.0 mmol/Kg de peso vía intraperitoneal con un tiempo de pretratamiento de 60 minutos, tiempo reportado como T_{max} en plasma.⁸⁶ En el caso de la vigabatrina se administró una dosis de 1.0 mmol/Kg con un tiempo de pretratamiento de 120 minutos, esto contrastado con lo mencionado en la bibliografía donde se reporta un tiempo de pretratamiento de 240 minutos,^{85,87,88} además, en experimentos realizados en el mismo laboratorio se reportó protección a partir de una dosis de 3.0 mmol/Kg con un tiempo de pretratamiento frente a la inducción química de convulsiones con PTZ de 240 minutos con una dosis de 95 mg/Kg de PTZ vía subcutánea. Tomando en cuenta que la vigabatrina es un inhibidor de la GABA-AT, y con el fin de hacer una comparación farmacocinética, se realizó un reto “mol a mol” tomando en cuenta el primer tiempo de pretratamiento seleccionado para los ligandos sintetizados, por lo que se realizó un pretratamiento de 120 minutos con una dosis de 1.0 mmol/Kg con la vigabatrina. Como control se tuvo un grupo tratado con solución salina isotónica, ya que las mezclas de los ligandos propuestos más el valproato sódico y vigabatrina fueron solubilizados en tal vehículo y administrados por la vía intraperitoneal.

12.2.1 Determinación de la actividad anticonvulsivante de la mezcla racémica de *N*-pantoilGABA

Se realizó el primer ensayo con la mezcla racémica de *N*-pantoilGABA a una dosis de 1.0 mmol/Kg con 120 minutos de pretratamiento para determinar la existencia de un efecto anticonvulsivo. Debido a la ausencia de protección contra las crisis inducidas por el PTZ, se decidió disminuir el tiempo de pretratamiento a 60 y 30 minutos, esto con la intención de encontrar un mejor tiempo de distribución

sistémica (Tabla 12-3). En los grupos de ensayo para esta mezcla, todos los ratones murieron posterior a la aparición de las crisis convulsivas del tipo tónico-clónico generalizadas. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa en el tiempo de latencia de la vigabatrina con respecto al control negativo, esto a pesar del tiempo de latencia y la dosis utilizada como referencia.

ligando Y tiempo (min)	Promedio del Número De CC ± DS	Latencia ± DS (min)	% ratones Muertos
Control negativo	2.8 ± 1.3	2.3 ± 1.51	100
60 VGB	2.0 ± 1.1	17.8 ± 21.3	20
60 VAS	4.0 ± 2.9	7.2 ± 4.07	33.3
30 PG	2.8 ± 1.3	2.6 ± 1.14	100
60 PG	2.0 ± 0.9	3.3 ± 1.03	100
120 PG	3.3 ± 1.2	2.7 ± 2.25	100

Tabla 12-3 Bioensayo sobre la mezcla racémica de *N*-pantoilGABA (PG) a diferentes tiempos utilizando como control positivo al valproato sódico (VAS) y vigabatrina (VGB). CC= crisis convulsivas. ANOVA de una vía, prueba post hoc de comparación múltiple de Bonferroni. *Estadísticamente significativo con respecto al control negativo y VAS $p < 0.05$.

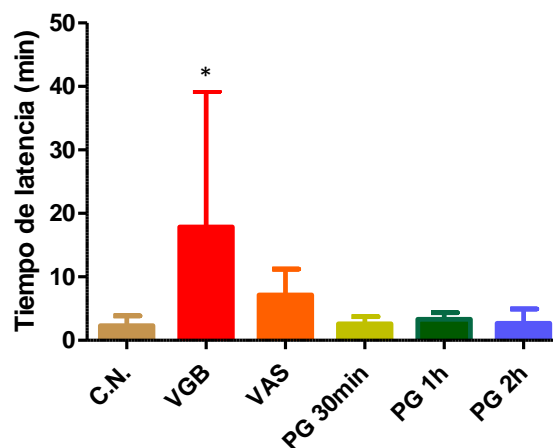


Ilustración 12-3 Gráfico que muestra el efecto sobre el tiempo de latencia a la primera crisis convulsiva posterior a la administración de PTZ (95 mg/Kg) para *N*-pantoil-GABA 1.0 mmol/Kg a diferentes tiempos. Prueba ANOVA de una vía sin diferencia estadísticamente significativa. ANOVA de una vía, prueba post hoc de comparación múltiple de Bonferroni. *Estadísticamente significativo con respecto al control negativo y VAS $p < 0.05$.

12.2.2 Determinación de la actividad anticonvulsivante de la mezcla de diastereoisómeros de *N*-pantoilVigabatrina

El primer ensayo realizado con la mezcla de *N*-pantoilVigabatrina, fue a una dosis de 1.0 mmol/Kg con una hora de pretratamiento; sin embargo, los resultados no fueron favorables, ya que algunos de los ratones presentaron estados preconvulsivos y uno manifestó convulsiones del tipo tónico-clónicas antes de la administración del PTZ, probablemente atribuibles a los efectos de toxicidad aguda de la mezcla. Aun así, se continuó con el ensayo con los ratones que solo presentaron un estado preconvulsivo, obteniendo los resultados presentados en la Tabla 12-4. Se puede observar que, a pesar de los efectos no esperados durante el pretratamiento, aumentó el tiempo de latencia a la aparición de la primera crisis convulsiva tónico-clónica posterior a la inducción por PTZ, a diferencia del grupo análogo para la mezcla de *N*-pantoilGABA.

Con base en el resultado anterior, se realizó un ensayo a la misma dosis, pero esta vez con un pretratamiento de dos horas, con el fin de buscar una mejor distribución sistémica del ligando. Los resultados obtenidos fueron semejantes al primer ensayo, además de que uno de los animales del grupo también presentó crisis convulsivas antes del tratamiento con el PTZ.

En respuesta al efecto preconvulsivante observado de las administraciones anteriormente mencionadas, se decidió disminuir la dosis a la mitad, administrando 0.5 mmol/Kg; se tomó en cuenta el resultado anterior de dos horas de pretratamiento donde se observó la prolongación del tiempo de latencia a la primera crisis convulsiva del tipo tónico-clónica, por lo que se decidió realizarlo a dos y cuatro horas de pretratamiento, obteniendo los resultados presentados en la Tabla 12-4 y representados en la Ilustración 12-4. Por último y para dar seguimiento a la búsqueda del mejor tiempo de distribución sistémica y dosis óptima, se disminuyó la dosis a 0.25 mmol/Kg con dos horas de pretratamiento, observándose una notable disminución del efecto protector contra el PTZ.

ligando Y tiempo (min)	Promedio de Numero De CC \pm DS	Latencia \pm DS (min)	% de ratones Muertos
control negativo	2.8 \pm 1.3	2.3 \pm 1.5	100
60 VAS	4.0 \pm 2.9	7.2 \pm 4.	33.3
120 VGB	2.0 \pm 1.1	17.8 \pm 21.3	20
60 PV 1 mmol/Kg	1.5 \pm 0.3	7.0 \pm 3.6	100
120 PV 1mmol/Kg	0.75 \pm 0.1	16.0 \pm 18.0	20
120 * PV 0.5mmol/Kg	0.33 \pm 0.2	47.0 \pm 20.0	0
240 PV 0.5mol/Kg	1.2 \pm 0.48	29.0 \pm 24.0	0
120 PV 0.25mmol/Kg	1.5 \pm 0.2	6.8 \pm 5.0	33.3

Tabla 12-4 Bioensayos sobre la mezcla racémica de *N*-pantoiilVigabatrina a diferentes tiempos y a diferentes concentraciones, teniendo como control positivo al valproato sódico (VAS). ANOVA de una vía, prueba post hoc y comparación múltiple de Bonferroni. *Estadísticamente significativo con respecto al control negativo y VAS $p < 0.05$.

En la Ilustración 12-4 se puede observar un comportamiento de tipo campana, más un pico de actividad del efecto protector a una dosis de 0.5 mmol/Kg a un tiempo de pretratamiento de 120 minutos frente a la inducción de las crisis convulsivas, mientras que, a dosis más altas, como sucedió en los ensayos de determinación de la DL₅₀, el efecto fue paradójico, presentando crisis convulsivas posteriores a la administración del ligando. Este comportamiento de tipo bifásico, encontrado para este ligando ya ha sido reportado para algunas benzodiazepinas como el midazolam, otras moléculas como el etanol y algunos metabolitos hormonales producidos durante el síndrome premenstrual;⁸⁹⁻⁹⁵ existe una relación dosis-respuesta, para la cual a dosis bajas, estos ligandos parecen comportarse como moduladores agonistas en un sitio alostérico de los receptores GABA_A, mientras que a dosis altas parecen comportarse como moduladores antagonistas en un sitio alostérico completamente diferente, exhibiendo un efecto paradójico inhibitorio sobre el sistema GABAérgico, desencadenando en la manifestación de los estímulos excitatorios como posible compensación opuesta, debutando con síntomas clínicos como irritabilidad, pérdida del control impulsivo, comportamiento agresivo hasta llegar a las crisis convulsivas como máximo exponente.⁹²

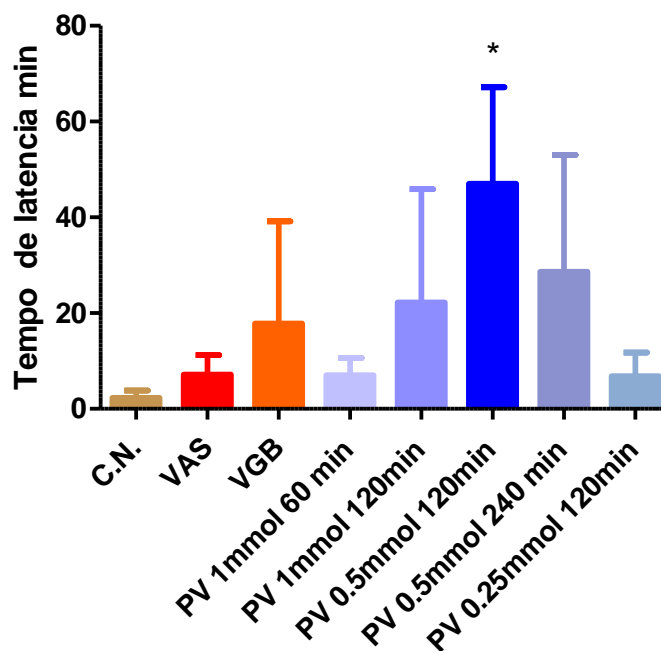


Ilustración 12-4 Gráfico que muestra el efecto sobre el tiempo de latencia a la primera crisis convulsiva posterior a la administración de una dosis de 95 mg/Kg de PTZ para *N*-pantovigabatrina a diferentes tiempos, concentraciones. VAS se administró con una dosis de 1 mmol/Kg al igual que la vigabatrina. El ensayo estadístico de ANOVA de una vía probó ser significativo para el post hoc de comparación múltiple de Bonferroni. *Estadísticamente significativo con respecto al control negativo y VAS $p < 0.05$.

13 Conclusiones

Mediante el uso de herramientas de la química computacional como lo son el *Docking* y la Dinámica molecular se realizó el diseño *in silico* de análogos de *N*-pantovigabatrina de forma racional; se observó que el núcleo pantoilo, agrega mayores interacciones al anclar con mayor fuerza a los aminoácidos Glu, Tyr, Gly y Arg, esto aunado a que conservan las mismas interacciones en la cadena análoga al ligando endógeno GABA con los aminoácidos Asn, Thr, Glu, Arg y Lys presentes en los sitios activos y ortostérico de GABA-AT y el receptor $GABA_{A\alpha 1\beta 2\gamma 2}$ respectivamente, siendo los diastereoisómeros de *N*-pantovigabatrina, los que presentaron mejores energías y modos de unión a los blancos proteicos utilizados del sistema GABAérgico, superando significativamente a su análogo vigabatrina y al propio valproato. La síntesis orgánica de la mezcla enantiomérica de *N*-

pantoilGABA y de la mezcla diastereomérica de *N*-pantoilVigabatrina se realizó mediante un método síntesis de tipo *solvent-free* (en línea con la química verde), y su posterior purificación mediante destilación a alto vacío, que permitió tener rendimientos de 81.5 % para el caso de la mezcla enantiomérica de *N*-pantoilGABA y 80.26% para la mezcla diasteromérica de *N*-pantoilVigabatrina. Cabe agregar que el método de extracción de tabletas comerciales de vigabatrina diseñado mediante el uso de resina de intercambio iónico, fue una alternativa que disminuyó los costos de la materia prima empleada, debido al alto precio comercial de la misma, contando con una alternativa rentable para su obtención. Las posteriores pruebas *in vivo* determinaron una toxicidad baja para la mezcla de *N*-pantoilGABA, sin embargo, para la mezcla de *N*-pantoilVigabatrina se observaron efectos tóxicos a concentraciones cercanas a la LD₅₀ y sobre todo un efecto paradójico al anticonvulsivo: proconvulsivo. Sin embargo, esto no impidió realizar los ensayos contra las crisis convulsivas inducidas con PTZ a dosis por debajo de la DL₅₀. Durante los ensayos *in vivo* se pudo observar efectos somáticos correspondientes a una modulación del sistema GABAérgico, esto difiriendo un poco con los resultados encontrados en la evaluación *in silico* de las propiedades ADME-Tox, cuyos resultados indicaban que los ligandos no atravesarían la barrera hematoencefálica. Con esto cabe mencionar que la Vitamina B5, ácido pantoténico, contiene la misma porción pantoilo, y la función de esta vitamina recae en la transferencia de grupos acilos, importantes para la formación de la CoA, molécula necesaria para diferentes rutas metabólicas como el ciclo de Krebs, por lo que se propone que el método de ingreso de los ligandos propuestos a sistema nervioso central es por medio de transportadores que reconoce la propia vitamina B5. Los ensayos *in vivo* permitieron encontrar la posología y el tiempo de distribución óptimo para poder alcanzar una concentración en plasma y por supuesto, una biodisponibilidad en el sistema nervioso central, reflejado en una actividad anticonvulsiva estadísticamente significativa de la mezcla diasterómerica de *N*-pantoilVigabatrina. Esto último correlacionado fuertemente con los ensayos de *docking* y dinámica que predijeron una modulación de proteínas del sistema GABAérgico. Con los resultados *in silico* e *in vivo* observados se propone que la

modulación de este ligando ocurre con un mecanismo similar al ya reportado para la vigabatrina, sin embargo, los grupos hidroxilo, metilo y el carbono carbonilo de la porción pantoilo, añaden mayores interacciones al reconocimiento por lo que aumenta su anclaje al sitio activo y, por otro lado, al sitio ortostérico de las proteínas utilizadas en los ensayos.

Se necesita la puesta en práctica de más ensayos *in silico*, *in vivo* e *in vitro* para continuar con el estudio de dichos ligandos y así proponer algún cambio molecular en la estructura, además de la síntesis de los ligandos enantiopuros y diastereopuros para ampliar el conocimiento del reconocimiento molecular a un nivel más exacto y comprobar la existencia de estereoselectividad. Aunado a esto, el diseño de ensayos que permitan realizar una valoración más profunda que acerque a los ligandos propuestos a la práctica clínica en contra de los diferentes síndromes epilépticos mediante la modulación del sistema GABAérgico.

14 Anexos

14.1 Preparación de columna Amberlite-IR-120

La preparación se realizó como se describe:

Se toma una cantidad considerable de resina para preparar una columna, se coloca en un embudo montado en soporte universal con un tapón de algodón y se enjuaga con agua bidestilada hasta eliminar el exceso de color. Colocar la resina en un matraz Erlenmeyer de 100 mL, agregar un volumen de solución de ácido clorhídrico 5N tal que suspenda por completo la resina y dejar agitando vigorosamente durante 30 min. Asegurarse con tira indicadora de pH que el pH de la suspensión sea ácido (aproximadamente $\text{pH} = 1$). Posterior en una columna se coloca un tapón ligero de algodón en la parte inferior para que las partículas de la resina no obstruyan la salida, con la ayuda de un embudo se vierte la resina suspendida en solución ácida dentro de la bureta montada en soporte universal sin dejar burbujas de aire. Eluir con agua bidestilada hasta eliminar el exceso de ácido comprobando con el goteo de la columna con tira indicadora de pH ($\text{pH} = 7$). Nota: no dejar que la solución o agua rebase el límite superior de la columna, ya que esto provoca que se formen burbujas y la columna se seque.

14.2 Extracción de vigabatrina a partir de tabletas SABRIL®

La preparación se realizó como se describe:

Triturar tabletas de SABRIL® en mortero con pistilo, solubilizar el sólido pulverizado en agua bidestilada considerando la solubilidad reportada de 55.1 mg/mL,⁸² agregando un 10% más de disolvente de la cantidad para saturarla. Ajustar a pH de 3 con solución 5N de HCl, dejar en agitación durante 60 minutos y filtrar a vacío. La solución obtenida se comienza a eluir en columna de amberlite-IR-120 de ácido fuerte previamente preparada, a una velocidad aproximada de 1 gota por cada dos segundos, seguir eluyendo con agua bidestilada hasta que el pH del goteo cambie a neutro comprobado con tira indicadora de pH. Posteriormente cambiar el matraz de recolección y comenzar a eluir a una mayor velocidad con solución NH₄OH 5N, hasta obtener el pH del goteo igual que el de la solución de NH₄OH, esto con la finalidad de bajar de la columna al aminoácido. Secar a vacío, volver a disolver con agua bidestilada y volver a destilar para eliminar los remanentes del hidróxido de amonio. Solubilizar en metanol y concentrar, agregar un volumen de acetona fría 100 veces mayor que el del metanol y dejar enfriar a temperatura ambiente para posterior filtrar y obtener cristales de vigabatrina. 86% de rendimiento recuperado con respecto al teórico por cantidad de tableta. Punto de fusión 175-176 °C.⁸²

15 Referencias bibliográficas

1. Wirrell E, Tinuper P, Perucca E, Moshé SL. Introduction to the epilepsy syndrome papers. *Epilepsia*. 2022;63(6):1330–2.
2. Silverman RB. Design and mechanism of GABA aminotransferase inactivators. Treatments for epilepsies and addictions. *Chem Rev*. 2018;118(7):4037–70.
3. Fisher RS, Cross JH, French JA, Higurashi N, Hirsch E, Jansen FE, et al. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2017;58(4):522–30.
4. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, et al. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*. 2014;55(4):475–82.
5. Megiddo I, Colson A, Chisholm D, Dua T, Nandi A, Laxminarayan R. Health and economic benefits of public financing of epilepsy treatment in India: An agent-based simulation model. *Epilepsia*. 2016;57(3):464–74.
6. Tang F, Hartz AMS, Bauer B. Drug-resistant epilepsy: Multiple hypotheses, few answers. *Front Neurol*. 2017;8(JUL):1–19.
7. Silvestro S, Mammana S, Cavalli E, Bramanti P, Mazzon E. Use of cannabidiol in the treatment of epilepsy: Efficacy and security in clinical trials. *Molecules*. 2019;24(8).
8. Desnoux B, Lenoir M, Doussau A, Marandyuk B, Beaulieu-Genest L, Poirier N, et al. Epilepsy and seizures in children with congenital heart disease: A prospective study. *Seizure [Internet]*. 2019;64(October 2018):50–3. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2018.11.011>
9. Kwan P, Arzimanoglou A, Berg AT, Brodie MJ, Hauser WA, Mathern G, et al. Definition of drug resistant epilepsy: Consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*. 2010;51(6):1069–77.
10. Perucca P, Gilliam FG. Adverse effects of antiepileptic drugs. *Lancet Neurol*. 2012;11(9):792–802.
11. Gaillard WD, Jette N, Arnold ST, Arzimanoglou A, Braun KPJ, Cukiert A, et al. Establishing criteria for pediatric epilepsy surgery center levels of care: Report from the ILAE Pediatric Epilepsy Surgery Task Force. *Epilepsia*. 2020;61(12):2629–42.
12. Rathore C, Radhakrishnan K. Concept of epilepsy surgery and presurgical evaluation. *Epileptic Disord*. 2015;17(1):19–31.
13. Louis Sanford Goodman, Laurence L. Bunton, Randa Hilal-Dandan, Björn C. Knollmann, Alfred Goodman Gilman, Alfred Gilman CTB. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 13th ed. Mc Graw Hill Education, editor. Ciudad de Mexico, Mexico; 2018.
14. Lorenzo Fernández P, Moreno González A, Leza Cerro JC, Lizasoain Hernández I, Moro Sánchez MÁ, Portalés Pérez A. *Velázquez Farmacología Básica y Clínica*. 19th ed. Panamericana M, editor. Ciudad de Mexico, Mexico: España; 2017. 237–257 p.
15. Löscher W, Gillard M, Sands ZA, Kaminski RM, Klitgaard H. Synaptic Vesicle Glycoprotein 2A Ligands in the Treatment of Epilepsy and Beyond. *CNS Drugs*. 2016;30(11):1055–77.
16. Madeo M, Kovács AD, Pearce DA. The human synaptic vesicle protein, SV2A, functions as a galactose transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 2014;289(48):33066–71.
17. Almenar C, Álvarez E, Estevez FJA, Baños J-E, Callado LF, Castro E, et al. *Neurofarmacología Contemporánea*. Primera ed. Zarraz J., Meana J, Menacho JG, editors. Barcelona, España: Elsevier; 2011.
18. Boron. WF, Bpulpap EL. *Fisiología médica*. 3rd ed. ELSEVIER, editor. Barcelona, España: Elsevier; 2017.
19. Kandel E, Schwartz J, Jessell T, Siegelbaum S, Hudspeth A. *Kandel Principles of Neural Science - 5th Edition*. 5th ed. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell M. T, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ, editors. United States: Mc Graw Hill Medical; 2013. 1758 p.
20. Le H V., Hawker DD, Wu R, Doud E, Widom J, Sanishvili R, et al. Design and Mechanism of Tetrahydrothiophene-Based γ -Aminobutyric Acid Aminotransferase Inactivators. *J Am Chem Soc*. 2015;137(13):4525–33.
21. Gökcan H, Monard G, Sungur Konuklar FA. Molecular dynamics simulations of apo, holo, and

- inactivator bound GABA-at reveal the role of active site residues in PLP dependent enzymes. *Proteins Struct Funct Bioinforma*. 2016;84(7):875–91.
22. Lee H, Le H V., Wu R, Doud E, Sanishvili R, Kellie JF, et al. Mechanism of Inactivation of GABA Aminotransferase by (E)- and (Z)-(1S,3S)-3-Amino-4-fluoromethylenyl-1-cyclopentanoic Acid. *ACS Chem Biol*. 2015;10(9):2087–98.
 23. Silverman RB. The 2011 E. B. Hershberg award for important discoveries in medically active substances: (1 S,3 S)-3-amino-4-difluoromethylenyl-1-cyclopentanoic acid (CPP-115), a GABA aminotransferase inactivator and new treatment for drug addiction and infantile Spasm. *J Med Chem*. 2012;55(2):567–75.
 24. Bergmann R, Kongsbak K, Sørensen PL, Sander T, Balle T. A Unified Model of the GABAA Receptor Comprising Agonist and Benzodiazepine Binding Sites. *PLoS One*. 2013;8(1).
 25. Puthenkalam R, Hieckel M, Simeone X, Suwattanasophon C, Feldbauer R V., Ecker GF, et al. Structural studies of GABAA receptor binding sites: Which experimental structure tells us what? *Front Mol Neurosci*. 2016;9(JUNE):1–20.
 26. Geng Y, Xiong D, Mosyak L, Malito DL, Kniazeff J, Chen Y, et al. Structure and functional interaction of the extracellular domain of human GABA B receptor GBR2. *Nat Neurosci* [Internet]. 2012;15(7):970–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nn.3133>
 27. Zhu S, Noviello CM, Teng J, Walsh RM, Kim JJ, Hibbs RE. Structure of a human synaptic GABAA receptor. *Nature*. 2018;559(7712):67–88.
 28. Sente A, Desai R, Naydenova K, Malinauskas T, Jounaidi Y, Miehlung J, et al. Differential assembly diversifies GABAA receptor structures and signalling. *Nature*. 2022;604(7904):190–4.
 29. Mavromoustakos T, Kellici Editors TF. *Rational Drug Design Methods and Protocols* [Internet]. 2018. 67–87 p. Available from: <http://www.springer.com/series/7651>
 30. Meng X-Y, Zhang H-X, Mezei M, Cui M. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. *Curr Comput Aided-Drug Des*. 2012;7(2):146–57.
 31. Śledź P, Cafilisch A. Protein structure-based drug design: from docking to molecular dynamics. *Curr Opin Struct Biol*. 2018;48:93–102.
 32. Jensen F. *Introduction to Computational Chemistry Computational Chemistry* [Internet]. 3rd ed. WILEY, editor. Vol. 132, *Theoretical Chemistry Accounts*. New York; 2017. 629 p. Available from: <https://www.wiley.com/en-br/Introduction+to+Computational+Chemistry,+3rd+Edition-p-9781118825990>
 33. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, et al. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(W1):W296–303.
 34. Forli W, Halliday S, Belew R, Olson A. AutoDock Version 4.2. *Citeseer* [Internet]. 2012;1–66. Available from: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.363.3063&rep=rep1&type=pdf>
 35. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* [Internet]. 2009;30:NA-NA. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcc.21334>
 36. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* [Internet]. 2009;32:NA-NA. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcc.21334>
 37. Vieira TF, Sousa SF. Comparing AutoDock and Vina in ligand/decoy discrimination for virtual screening. *Appl Sci*. 2019;9(21).
 38. Eberhardt J, Santos-Martins D, Tillack AF, Forli S. AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. *J Chem Inf Model*. 2021;61(8):3891–8.
 39. Nguyen NT, Nguyen TH, Pham TNH, Huy NT, Bay M Van, Pham MQ, et al. Autodock Vina Adopts More Accurate Binding Poses but Autodock4 Forms Better Binding Affinity. *J Chem Inf Model*. 2020;60(1):204–11.
 40. Brodie MJ. Antiepileptic drug therapy the story so far. *Seizure* [Internet]. 2010;19(10):650–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.seizure.2010.10.027>
 41. Tomson T, Battino D, Perucca E. Valproic acid after five decades of use in epilepsy: Time to reconsider the indications of a time-honoured drug. *Lancet Neurol*. 2016;15(2):210–8.

42. Singh D, Gupta S, Singh I, Morsy MA, Nair AB, Ahmed ASF. Hidden pharmacological activities of valproic acid: A new insight. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2021;142(July):112021. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112021>
43. Sternbach LH. The Benzodiazepine Story. *J Med Chem*. 1979;22(1):1–7.
44. Kwan P, Brodie MJ. Phenobarbital for the treatment of epilepsy in the 21st century: A critical review. *Epilepsia*. 2004;45(9):1141–9.
45. LIPPERT B, METCALF BW, JUNG MJ, CASARA P. 4-Amino-hex-5-enoic Acid, a Selective Catalytic Inhibitor of 4-Aminobutyric-Acid Aminotransferase in Mammalian Brain. *Eur J Biochem*. 1977;74(3):441–5.
46. Tolman JA, Faulkner MA. Vigabatrin: A comprehensive review of drug properties including clinical updates following recent FDA approval. *Expert Opin Pharmacother*. 2009;10(18):3077–89.
47. VIDAL VADEMECUM. Vigabatrina. 2015.
48. Pan Y, Qiu J, Silverman RB. Design, Synthesis, and Biological Activity of a Difluoro-Substituted, Conformationally Rigid Vigabatrin Analogue as a Potent γ -Aminobutyric Acid Aminotransferase Inhibitor. *J Med Chem*. 2003;46(25):5292–3.
49. Saldívar-González F, Prieto-Martínez FD, Medina-Franco JL. Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional. *Educ Quim*. 2017;28(1):51–8.
50. Tovar-Gudi o E, Guevara-Salazar JA, Bahena-Herrera JR, Trujillo-Ferrara JG, Martínez-Campos Z, Razo-Hernandez RS, et al. Novel-substituted heterocyclic GABA analogues. Enzymatic activity against the GABA-AT enzyme from *Pseudomonas fluorescens* and in silico molecular modeling. *Molecules*. 2018;23(5).
51. Kopelevich VM, Evdokimova GS, Marieva TD, Shmuilovich ML. SYNTHESIS OF D-HOMOPANTOTHENIC ACID. *Pharm Chem J*. 1971;5(9):534–536.
52. Evans DA, Wu J, Masse CE, MacMillan DWC. A general method for the enantioselective synthesis of pantolactone derivatives. *Org Lett*. 2002;4(20):3379–82.
53. Zhang QH, Fang Y, Luo WF, Huang LN. Biocatalytic kinetic resolution of d,l-pantolactone by using a novel recombinant d-lactonase. *RSC Adv*. 2020;11(2):721–5.
54. Kagan F, Heinzelman R V., Weisblat DI, Greiner W. A Novel Resolution of Pantolactone—The Synthesis of D(+)-Calcium Pantothenate. *J Am Chem Soc*. 1957;79(13):3545–9.
55. Días. M, Basilio O A, Cruz V F, Briones Garduño J. Trauma Un problema de salud en México [Internet]. *Trauma*. 2016. 124 p. Available from: https://www.mendeley.com/catalogue/cbccf7f9-9b12-37de-8fec-3450e345e36c/?utm_source=desktop&utm_medium=1.19.4&utm_campaign=open_catalog&userDocumentId=%7Be8fa2a38-c070-4db1-8add-9e1148e8668d%7D
56. Wlostowski M, Rowicki T, Synoradzki L. Application of 1,1,3,3-tetramethylguanidine in the reaction of amino acids with pantolactone. *Tetrahedron Asymmetry*. 2004;15(15):2333–8.
57. Voronina TA, Litvinova SA. Pharmacological effects and clinical application of pantogam and pantogam active. *Zhurnal Nevrol i psikiatrii im SS Korsakova* [Internet]. 2017;117(8):132. Available from: <http://www.mediasphera.ru/issues/zhurnal-nevrologii-i-psikiatrii-im-s-s-korsakova/2017/8/downloads/ru/1199772982017081132>
58. Kupriyanova TA, Koren E V., Alabusheva NN. A strategy for increasing the efficiency of psychopharmacological treatment of hyperkinetic behavior disorder with pantogam. *Zhurnal Nevrol i psikiatrii im SS Korsakova* [Internet]. 2017;117(11):75. Available from: <http://www.mediasphera.ru/issues/zhurnal-nevrologii-i-psikiatrii-im-s-s-korsakova-2/2017/11/downloads/ru/1199772982017112075>
59. NAKAHIRO M, NISHI N, FUKUCHI I, MOCHIZUKI D, KATO S, MIZUSHIMA A, et al. Effects of pantoyl-GABA on GABAA and GABAB receptors in the rat brain. *Jpn J Pharmacol* [Internet]. 1987;45(2):292–4. Available from: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/jphs1951/45.292?from=CrossRef>
60. Nakahiro M, Fujita N, Fukuchi I, Saito K, Nishimura T, Yoshida H. Pantoyl-gamma-aminobutyric acid facilitates cholinergic function in the central nervous system. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 1985 Feb;232(2):501–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2982013>
61. Zavadenko NN, Suvorinova NY, Vakula IN, Malinina E V., Kuzenkova LM. Pharmacotherapy of Attention Deficit Hyperactivity Disorder in Children: Results of a Multicenter, Double-Blind, Placebo-

- Controlled Trial of Hopantenic Acid. *Neurosci Behav Physiol.* 2019;49(1):129–35.
62. Быков ЮВ, Беккер ПА. Перспективы применения гопантеновой кислоты в психиатрической практике. 2018;(December).
 63. ITECH.group. Pantogam® tablets.
 64. ACD/Structure Elucidator. Advanced Chemistry Development, Inc. Toronto, ON, Canada; 2019.
 65. Roy Dennington, Todd A. Keith, and John M. Millam SI. GaussView, Version 6. Shawnee Mission, KS; 2016.
 66. ChemAxon. Marvin 18.9 [Internet]. 2013. Available from: <http://www.chemaxon.com/>
 67. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. V. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. I. Gaussian 16, Revision C.01. Wallingford CT: Gaussian, Inc.; 2016.
 68. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 1997;23(1–3):3–25.
 69. Hitchcock SA, Pennington LD. Structure-brain exposure relationships. *J Med Chem.* 2006;49(26):7559–83.
 70. Ulica N. molinspiration cheminformatics [Internet]. Slovak Republic. 2018. Available from: <https://www.molinspiration.com/>
 71. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep [Internet].* 2017;7(October 2016):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep42717>
 72. en Juan Alberto Guevara Salazar MC, Alejandro Jiménez Vázquez José Guadalupe Trujillo Ferrara México H. “Síntesis y estudio teórico de aductos Diels-Alder derivados de los ácidos maleico y fumárico, y su actividad biológica sobre la enzima aminotransferasa del GABA” Instituto Politécnico Nacional Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politecnico Nacional; 2010.
 73. Liu W, Peterson PE, Carter RJ, Zhou X, Langston JA, Fisher AJ, et al. Crystal structures of unbound and aminoxyacetate-bound Escherichia coli γ -aminobutyrate aminotransferase. *Biochemistry.* 2004;43(34):10896–905.
 74. Forli W, Halliday S, Belew R, Olson A. AutoDock Version 4.2. Citeseer. 2012;1–66.
 75. Allouche A. Software News and Updates Gabedit — A Graphical User Interface for Computational Chemistry Softwares. *J Comput Chem.* 2012;32:174–82.
 76. Lindahl, Abraham, Hess, Spoel van der. GROMACS Documentation. 2021; Available from: <http://manual.gromacs.org/documentation/5.1.4/%0Ahttp://files/1243/5.1.html%0Ahttp://manual.gromacs.org/2019-current/manual-2019.6.pdf>
 77. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics. *J Mol Graph [Internet].* 1996 Feb;14(1):33–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0263785596000185>
 78. Lorke D. A new approach to practical acute toxicity testing. *Arch Toxicol.* 1983;54(4):275–87.
 79. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
 80. 07-16-96 NORMA Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995, Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres.
 81. Calderon RO, Attema B, DeVries GH. Lipid Composition of Neuronal Cell Bodies and Neurites from Cultured Dorsal Root Ganglia. *J Neurochem.* 1995;64(1):424–9.
 82. PUBCHEM. VIGABATRIN [Internet]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vigabatrin#section=Melting-Point>
 83. NISHIZAWA Y, KODAMA T, ISHIDA R, ADACHI H, KOWA Y. Electrophysiological Investigations of Homopantothenic Acid. *J Vitaminol (Kyoto) [Internet].* 1968;14(4):345–53. Available from: http://www.jstage.jst.go.jp/article/jnsv1954/14/4/14_4_345/_article
 84. Marieva TD, Kotelevich VM, Kovler MA, Avakumov VM, Gunar VI. Synthesis and neurotropic activity of N-(D-homopantothenoyl)-N,N'-dicyclohexylurea. *Pharm Chem J [Internet].* 1980 Aug;14(8):546–8. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/BF00765838>
 85. Luszczki JJ, Wojcik-Cwikla J, Andres MM, Czuczwar SJ. Pharmacological and behavioral characteristics

- of interactions between vigabatrin and conventional antiepileptic drugs in pentylenetetrazole-induced in mice: An isobolographic analysis. *Neuropsychopharmacology*. 2005;30(5):958–73.
86. Markowitz GJ, Kadam SD, Boothe DM, Irving ND, Comi AM. The pharmacokinetics of commonly used antiepileptic drugs in immature CD1 mice. *Neuroreport* [Internet]. 2010 Apr 21;21(6):452–6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
 87. Grant SM, Heel RC. Vigabatrin: A Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Potential in Epilepsy and Disorders of Motor Control. *Drugs*. 1991;41(6):889–926.
 88. Meldrum BS, Murugaiah K. Anticonvulsant action in mice with sound-induced seizures of the optical isomers of γ -vinyl GABA. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 1983 Apr;89(1–2):149–52. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0014299983906209>
 89. Riss J, Cloyd J, Gates J, Collins S. Benzodiazepines in epilepsy: Pharmacology and pharmacokinetics. *Acta Neurol Scand*. 2008;118(2):69–86.
 90. Wang DS, Lu SY, Hong Z, Zhu HL. Biphasic action of midazolam on GABAA receptor-mediated responses in rat sacral dorsal commissural neurons. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;309(4):893–9.
 91. Kopanitsa M V., Zhuk O V., Zinkovsky VG, Krishtal OA. Modulation of GABAA receptor-mediated currents by phenazepam and its metabolites. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2001;364(1):1–8.
 92. Bäckström T, Haage D, Löfgren M, Johansson IM, Strömberg J, Nyberg S, et al. Paradoxical effects of GABA-A modulators may explain sex steroid induced negative mood symptoms in some persons. *Neuroscience* [Internet]. 2011;191:46–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.03.061>
 93. Ben-Ari Y. Is the awakening produced by benzodiazepines due to excitatory actions of GABA? *Transl Med Commun*. 2021;6(1).
 94. Bäckström T. Premenstrual syndrome (PMS) due to allopregnanolone paradoxical effects but possible to treat? *Maturitas* [Internet]. 2021;152:68–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2021.08.012>
 95. Beltrán González AN, Pomata PE, Goutman JD, Gasulla J, Chebib M, Calvo DJ. Benzodiazepine modulation of homomeric GABA ρ 1 receptors: Differential effects of diazepam and 4'-chlorodiazepam. *Eur J Pharmacol*. 2014;743:24–30.