

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**“Síntesis y actividad antiepiléptica de pirrolidonas 1,4-
disustituidas”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA

Q.F.B. AMELIA FABIOLA CHÁVEZ ELÍAS

DIRIGIDA POR

Dr. RUBÉN ANTONIO ROMO MANCILLAS

CO-DIRECCIÓN

Dra. JULIETA G. MENDOZA TORREBLANCA

QUERÉTARO

CENTRO UNIVERSITARIO

ENERO 2018

MÉXICO



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencias Químico Biológicas

"Síntesis y actividad antiepiléptica de pirrolidonas 1,4-disustituidas"

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestría en Ciencias Químico Biológicas

Presenta:

Q.F.B. Amelia Fabiola Chávez Elías

Dirigido por:

Dr. Rubén Antonio Romo Mancillas

Dr. Rubén Antonio Romo Mancillas
Presidente

Firma

Dra. Julieta G. Mendoza Torreblanca
Secretario

Firma

Dra. Yolanda Alcaraz Contreras
Vocal

Firma

Dra. María Alejandra Rojas Molina
Suplente

Alejandra Rojas M.

Firma

Dr. Mamadou Moustapha Bah
Suplente

Firma

M.S.P. Sergio Páchecho Hernández
Director de la Facultad

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Querétaro por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría en el Posgrado en Ciencias Químico Biológicas y al Laboratorio de Productos Naturales, por permitirme desarrollar este proyecto en sus instalaciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante mis estudios de maestría (número de becario 590035), además de la Beca Mixta 2017 para Modalidad Nacional y por el financiamiento del proyecto INFRA-2015-01-252013.

A Redes Temáticas SEP-PRODEP por el apoyo otorgado por el proyecto “Estudio químico, farmacológico y nutrimental de especies empleadas en la Medicina Tradicional Mexicana”.

Al Instituto Nacional de Pediatría por el apoyo para el proyecto registrado como INP C-002/2017 y por permitirme realizar la estancia de investigación en el Laboratorio de Neurociencias y la Unidad de Equipos para Investigación Traslacional en Modelos Animales (UEITMA).

A la Universidad del Papaloapan por permitirme realizar la estancia de investigación, así como al Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencia y Nanotecnología (LINAN-Tuxtepec), por los equipos proporcionados para el análisis espectroscópico y espectrométrico.

Al Dr. Antonio Romo por darme la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo, por compartir sus conocimientos en química farmacéutica, pero en especial por enseñarme lo maravillosa que es la síntesis orgánica, a pesar de ser complicada. Por tener confianza en que podría desarrollar este trabajo de investigación, por su apoyo académico y personal durante los percances que aparecieron a lo largo de mis estudios de maestría, y lo más importante por tener la paciencia para guiarme en este largo camino.

A la Dra. Julieta Mendoza por ayudarme en mi formación académica, compartiendo su conocimiento sobre modelos biológicos para epilepsia. Por apoyarme en todo momento durante la estancia en el INP, por el interés mostrado hacia el proyecto de investigación y por sus consejos académicos y personales brindados en el tiempo compartido. Gracias doctora por ayudarme aún estando lejos, gracias por su paciencia.

Al Dr. Adolfo López por la estancia realizada bajo su dirección en la Universidad del Papaloapan, por ayudarme en la caracterización de los compuestos. Además de su apoyo personal y académico para realizar mis estudios de maestría, así como motivarme a seguir siempre adelante.

Al Dr. Rafael Castillo y la Dra. Alicia Hernández por brindarme sus conocimientos y compartirme sus experiencias académicas, por orientarme y ayudarme en este proyecto. Al M. en C. Pedro Trejo por ayudarme a adaptarme fácilmente al Laboratorio 122 y por compartir conmigo sus conocimientos sobre reacciones de transmetalación, así como los consejos brindados para el proyecto. Gracias Laboratorio 122 (F.Q, UNAM) por tener un ambiente de trabajo tan agradable, ser excelentes personas y tratarme tan calurosamente

durante el tiempo compartido (Naye, Diana, Lucy, Elkin, Ángel, Sebas, Jorge, Gus, Zavala y Francisco).

A la E.B.C. Edna García, a la técnico laboratorista Sara Navarrete, por ayudarme en el Laboratorio de Neurociencias; al M.V.Z. Ramón García, al M.V.Z. Jairo Hernández y Gilberto Cárdenas por su apoyo para el manejo y alimentación de los animales de experimentación. Al Dr. Sergio Zamudio, a la M. en C. Priscila Vázquez y a la M. en C. Jatziri Contreras por su ayuda en el modelo biológico y el manejo de los animales. A Naye y a Naty, por ayudarme con el análisis de los cerebros, por su amistad. Gracias mis niñas.

A Guillermo (Memo), por tu infinita paciencia y tu amistad, por hacer los días de trabajo más divertidos. Gracias por compartir parte de tu tiempo y experiencias, por motivarme todos los días, por tus consejos, por obligarme a comer, por hacerme reír, por no dejarme caer y por apoyarme en los peores momentos.

A Eli y Ale, gracias chiquitinas por hacer las clases más divertidas, por compartir comidas, experiencias y estar conmigo.

A Fili, por compartir conmigo grandes momentos, por apoyarme y motivarme aún estando lejos. Por confiar en que puedo realizar cosas interesantes y creer en que puedo dar más cada día. Gracias por tu amistad.

A Dany, por compartir tantas experiencias, por apoyarme en todo momento, por brindarme tu amistad, por ayudarme a salir adelante y a encontrarle el lado bueno a las cosas y estar juntas en las buenas y no tan buenas. Gracias por ayudarme a comprender que cuando te dicen, “no puedes”, es cuando más debes de luchar por conseguirlo.

A Edna, gracias chiquita por brindarme tu amistad, por abrirme las puertas de tu casa y de tu corazón, por tus valiosos consejos, por escucharme, apoyarme y nunca dejarme, por creer en mí y motivarme a seguir adelante, por todas las cosas que hemos compartido, por tantos abrazos confortables, no encontraré las palabras indicadas para decirte lo inmensamente agradecida que estoy contigo.

A Giovanni, gracias por retarme en todo momento, por enseñarme lo bella que es la síntesis orgánica, por quedarte a trabajar hasta altas horas de la madrugada, por confiar en que podía lograrlo. Gracias por no dejarme a pesar de sólo estar peleando, me enseñaste lo que es una verdadera amistad y a creer en mí. Gracias por todo lo que has hecho por mí, por aguantarme en los peores momentos y por decir “basta” cuando es necesario, por hacerme ver mis errores, pero a pesar de todo lo malo, siempre estar a mi lado.

A Dios, por poner a las personas indicadas en mi camino, para aprender de ellas.

***Dedicada a las personas que les debo todo lo que soy.... Mi familia...
Mamá, papá, Noé y José...
Ustedes han sido mis pilares, han creído y confiado en mí a pesar de todo...
Los quiero y los amo con todo mi ser...
Gracias...***

Papá...

Gracias por todos tus regaños, tus consejos, tus enseñanzas, en sí por cada palabra, gracias por guiarme en todo momento, gracias por motivarme a ser mejor cada día, por enseñarme a levantarme y seguir...

Todo lo que soy es gracias a ti.

Te amo viejito

RESUMEN

La epilepsia es el tercer trastorno neurológico a nivel mundial y afecta aproximadamente a 50 millones de personas, con un índice elevado de pacientes en países en vías de desarrollo dado que el acceso a un tratamiento farmacológico es limitado. Para tratar este trastorno, existen aproximadamente 20 fármacos anticonvulsivos que son administrados en los diferentes tipos de epilepsia; entre éstos destaca el levetiracetam por ser una molécula con propiedades fisicoquímicas y farmacológicas cercanas a las de un fármaco anticonvulsivo ideal, presenta un mecanismo único para el control de las crisis convulsivas: la interacción con la proteína de vesículas sinápticas 2A (SV2A). En la actualidad, el porcentaje de pacientes farmacorresistentes es elevado, por lo tanto, es necesario ampliar la gama de compuestos que puedan presentar efecto anticonvulsivo. Por ello, el objetivo principal de este proyecto fue sintetizar y caracterizar tres moléculas análogas al levetiracetam (AFCE-01, AFCE-02 y AFCE-03), adicionando en las posiciones 1 y 4 del anillo de pirrolidona, sustituyentes de carácter aromático, además de evaluar su efecto anticonvulsivo en un modelo biológico de crisis parciales. Se sintetizaron los compuestos AFCE-01 y AFCE-03, los cuales retardaron el desarrollo de crisis convulsivas en el modelo biológico de litio-pilocarpina. Con la dosis de 3 $\mu\text{mol/kg}$, estos compuestos presentaron valores para el tiempo de latencia de 167 ± 15.7 min y 111.7 ± 28 min respectivamente, con una $p < 0.05$.

Palabras clave: Epilepsia, SV2A, racetams, litio-pilocarpina, farmacorresistencia

ABSTRACT

Epilepsy is the third neurological disorder that affects approximately 50 million people worldwide, with a high proportion of them in developing countries due to limited access to pharmacological treatment. There are approximately 20 anticonvulsive drugs that are administered in different types of epilepsy; among them levetiracetam (LEV) stands out due to its physicochemical and pharmacological properties, that are close to those of an ideal antiepileptic drug, and its unique mechanism for the control of seizures: interaction with the synaptic vesicle protein 2A (SV2A). The percentage of drug-resistant patients is high; therefore, it is necessary to expand the range of compounds that may have an anticonvulsant effect. The main objective of this project was to synthesize and characterize three analogues of LEV (AFCE-01, AFCE-02 and AFCE-03), by adding in positions 1 and 4 of the pyrrolidone ring, aromatic substituents, and additionally to evaluate its anticonvulsive effect in a biological model of partial seizures. The compounds AFCE-01 and AFCE-03 were successfully synthesized, and using a dose of 3 $\mu\text{mol/kg}$, retarded the development of convulsive seizures in the lithium-pilocarpine biological model, with a time of latency = 167 ± 15.7 min and 111.7 ± 28 min respectively, ($p < 0.05$).

Keywords: Epilepsy, SV2A, racetams, lithium-pilocarpine, drug-resistance

CONTENIDO

RESUMEN.....	I
ABSTRACT.....	VI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Generalidades de la epilepsia.....	3
2.2 Tratamiento farmacológico para la epilepsia.....	5
2.3 Fármacos anticonvulsivos (FAE's).....	6
2.4 Levetiracetam.....	10
2.5 Proteínas de vesículas sinápticas 2.....	11
2.6 Proteína de vesículas sinápticas 2A (SV2A).....	13
2.7 Interacción de los racetams con la proteína SV2A.....	15
2.8 Diseño de moléculas análogas a levetiracetam.....	16
3. JUSTIFICACIÓN.....	19
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	20
5. HIPÓTESIS.....	20
6. OBJETIVOS.....	21
6.1 Objetivo General.....	21
6.2 Objetivos Particulares.....	21
7. METODOLOGÍA.....	22
7.1 Síntesis orgánica y caracterización química.....	23
7.2 Pruebas biológicas.....	25
7.2.1 Animales.....	25
7.2.2 Inducción de crisis convulsivas y administración de las moléculas sintetizadas.....	26
7.2.3 Registro de crisis convulsivas.....	27
7.2.4 Sacrificio de animales.....	28
7.2.5 Variables de estudio.....	28
7.2.6 Análisis estadístico.....	29
8. RESULTADOS.....	30
8.1 Síntesis orgánica.....	30
8.1.1 Obtención de (S)-6-(5-oxotetrahidrofuran-3-il)picolinamida.....	30
8.1.2 Obtención de 6-(5-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)picolinamida.....	31
8.1.3 Síntesis de (S)-6-(1,4-dihidroxibutan-2-il)-N-(isoquinolin-5-il)picolinamida (AFCE-01).....	32

8.1.4 Síntesis de (S)-6-(1-(benzotiazol-4-il)-5-oxopirrolidin-3-il)picolinamida (AFCE-02)	35
8.1.5 Síntesis (N-(2-amino-6-(metosicarbonil)fenil)acetamido) cloruro de aluminio (AFCE-03)	36
8.2 Evaluación biológica	39
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	43
10. CONCLUSIONES	48
11. PERSPECTIVAS	49
12. REFERENCIAS	50
13. ANEXOS	56

ANEXOS

Anexo 1	Espectro de masas de la molécula 6-(hidroxi(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)picolinamida.	56
Anexo 2	Espectro de masas de la molécula 5-aminoisoquinolina.	57
Anexo 3	Espectro de masas de la molécula AFCE-01.	58
Anexo 4	Espectro de RMN ¹ H de la molécula AFCE-01	59
Anexo 5	Espectro de RMN ¹³ C de la molécula AFCE-01	60
Anexo 6	Espectro de RMN DEPT ¹³ C de la molécula AFCE-01	61
Anexo 7	Espectro de RMN HSQC de la molécula AFCE-01	62
Anexo 8	Espectro de masas de AFCE-03	63
Anexo 9	Espectro de RMN ¹ H de la molécula AFCE-03	64
Anexo 10	Espectro de RMN ¹³ C de la molécula AFCE-03	65
Anexo 11	Espectro de RMN DEPT ¹³ C de la molécula AFCE-03	66
Anexo 12	Espectro de RMN COSY de la molécula AFCE-03	67
Anexo 13	Espectro de RMN HSQC de la molécula AFCE-03	68
Anexo 14	Espectro de masas de la 6-(1-(isoquinolin-5-il)-2,5-dihidro-1H-pirrol-3-il)picolinamida	69
Anexo 15	Espectro de masas de la molécula de AFCE-03 (MS/MS)	70

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1	Ruta sintética para la formación de los análogos de LEV: AFCE-01, AFCE-02 y AFCE-03.	23
Esquema 2	Ruta sintética para obtención de (S)-6-(5-oxotetrahidrofuran-3-il)picolinamida.	30
Esquema 3	Ruta sintética para obtención de 6-(5-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)picolinamida.	31
Esquema 4	Ruta sintética para obtención de (S)-6-(1,4-dihidroxibutan-2-il)-N-(isoquinolin-5-il)picolinamida (AFCE-01).	32
Esquema 5	Ruta sintética para obtención de (S)-6-(1-(benzotiazol-4-il)-5-oxopirrolidin-3-il)picolinamida (AFCE-02).	35
Esquema 6	Ruta sintética para obtención de la (N-(2-amino-6-(metoxicarbonil)fenil)acetamida)cloruro de aluminio (AFCE-03).	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Principales mecanismos de acción de los fármacos anticonvulsivos.	9
Figura 2	Estructura química del levetiracetam.	10
Figura 3	Modelo estructural de la proteína de vesículas sinápticas SV2A.	14
Figura 4	Estructura primaria de la proteína SV2A.	14
Figura 5	Interacción de los racetams con SV2A.	18
Figura 6	Molécula base para la obtención de los análogos de levetiracetam modificados en posición 1.	21
Figura 7	Diagrama de la evaluación de la actividad anticonvulsiva en los diferentes grupos experimentales, usando el modelo de inducción de crisis convulsivas con litio-pilocarpina (Li-PILO).	26
Figura 8	Tiempo de latencia para el desarrollo de crisis convulsivas administrando SS, DZP, LEV, AFCE-01 y AFCE-03 como pretratamiento vía i.c.v. en el modelo de inducción de crisis convulsivas con Li-PILO.	41
Figura 9	Dibujo de la sección coronal del sitio de la inyección i.c.v.	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Clasificación de los fármacos antiepilépticos (FAE's) por generaciones.	7
Tabla 2	Información general de las proteínas de la familia SV2.	13
Tabla 3	Grupos experimentales.	25
Tabla 4	Administración de compuestos vía i.c.v.	27
Tabla 5	Clasificación de convulsiones (escala de Racine).	28
Tabla 6	Variables de estudio a evaluar en el modelo animal de crisis convulsivas provocadas con Li-PILO.	28
Tabla 7	Consumo de hidrógeno requerido para llevar a cabo la reacción de reducción de la 5-nitroisoquinolina.	33
Tabla 8	Desplazamientos químicos de la molécula AFCE-01 RMN ¹ H (400 Hz, DMSO- <i>d</i> ₆)	34
Tabla 9	Desplazamientos químicos de la molécula AFCE-01 RMN ¹³ C (100 Hz, DMSO- <i>d</i> ₆)	34
Tabla 10	Desplazamientos químicos de la molécula AFCE-03 RMN ¹ H (400 Hz, DMSO- <i>d</i> ₆)	37
Tabla 11	Desplazamientos químicos de la molécula AFCE-01 RMN ¹³ C (100 Hz, DMSO- <i>d</i> ₆)	38
Tabla 12	Resumen de las moléculas sintetizadas	38
Tabla 9	Resultados de la evaluación biológica empleando el modelo animal de crisis convulsivas inducidas con Li-PILO.	40

1. INTRODUCCIÓN

La epilepsia es el tercer trastorno neurológico caracterizado por la presencia de crisis convulsivas recurrentes que afecta del 0.5 al 1.5 % de la población mundial sin hacer distinción entre edad, género, raza o nivel económico. Los mayores niveles de incidencia se han observado en los países en vías desarrollo, dado que la etiología está asociada con traumatismos craneoencefálicos, infecciones del sistema nervioso central (SNC), fiebres mal controladas, tumores y en su mayoría por causas idiopáticas. En México, aproximadamente 2 millones de personas padecen este trastorno. Este trastorno puede desarrollarse a cualquier edad, aunque los mayores porcentajes de incidencia se presentan en el sector infantil (niños de 0 a 1 año) y en las personas de la tercera edad (mayores de 65 años), sin descartar que puede presentarse a cualquier edad. La primera elección para el tratamiento de la epilepsia es la administración de fármacos anticonvulsivos (FAE's), primero con monoterapia y si las convulsiones persisten, se hace un reajuste en dosis o se administra una combinación de FAE's. En la actualidad, se encuentran disponibles más de 20 FAE's para administrarse en humanos, los cuales se han clasificado en tres generaciones, destacando que los FAE's de primera generación producen efectos secundarios severos en los pacientes, por ejemplo: daño hepático, ataxia, alteraciones gastrointestinales, teratogenicidad, entre otras.

El levetiracetam (LEV) es un FAE de segunda generación, derivado de la pirrolidona, con características farmacológicas cercanas a las de un fármaco anticonvulsivo ideal; además presenta un mecanismo de acción único, el cual se basa en la interacción con la proteína de vesículas sinápticas 2A (SV2A). Esta proteína está conformada por 742 aminoácidos divididos en 12 dominios transmembranales; sin embargo, la estructura de SV2A no ha sido resuelta por cristalografía y tampoco por resonancia magnética nuclear. Por dicha razón, los estudios de interacción entre ligando y proteína se han realizado con un modelo tridimensional diseñado mediante modelado por homología, dinámica y acoplamiento molecular. Por otra parte, se han propuesto varias modificaciones estructurales a la molécula de LEV definiendo la importancia del anillo de pirrolidona

en la estructura de los racetams (análogos de LEV); en cambio, se ha observado que el grupo butancarboxamida puede ser sustituido por un grupo aromático que presente donadores o aceptores de puentes de hidrógeno y en posición 4 del anillo, se sugiere una quiralidad definida y un grupo aromático con donadores de puentes de hidrógeno como sustituyente en dicha posición.

Dado que aproximadamente un 20 % de los pacientes epilépticos presentan farmacoresistencia, es importante ampliar la gama de moléculas líderes que pudieran ser empleadas en el tratamiento de los diferentes tipos de epilepsia. Para ello, en este trabajo, se realizó la modificación estructural de LEV en posiciones 1 y 4 del anillo de pirrolidona, empleando grupos funcionales que confieren a la molécula mayor afinidad por SV2A. El objetivo principal del proyecto fue sintetizar, caracterizar estructuralmente y evaluar los análogos de LEV en un modelo biológico de crisis convulsivas inducidas con litio-pilocarpina.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de la epilepsia

La epilepsia ha sido definida por la organización mundial de la salud (OMS) y la liga internacional contra la epilepsia (ILAE, por sus siglas en inglés), como un trastorno cerebral crónico caracterizado por crisis convulsivas recurrentes provocadas por descargas neuronales anormales en el cerebro. Estas convulsiones son breves episodios de movimientos involuntarios afectando una parte del cuerpo o la totalidad del mismo. Cabe señalar que todas las personas son propensas a presentar al menos una convulsión a lo largo de su vida, esto como consecuencia de agresiones agudas al cerebro o factores precipitantes. Por lo tanto, una persona con epilepsia será la que presente dos o más crisis convulsivas no provocadas, las cuales pueden ir desde episodios breves de ausencia hasta convulsiones prolongadas y graves. Además, la frecuencia de las crisis convulsivas puede variar desde presentarse solamente una vez al año hasta varias al día. La OMS ha reportado que la epilepsia es una de las enfermedades no transmisibles con mayor prevalencia en el mundo puesto que aproximadamente 50 millones de personas la padecen, localizándose el 80 % de los enfermos en países en vías de desarrollo. En Latinoamérica, la prevalencia es de 14 por cada 1000 habitantes, mientras que en México va en un rango de 11-15 por cada 1000 personas; por lo tanto, se calcula que en nuestro país el número de pacientes con epilepsia es de aproximadamente 2 millones de personas (OMS, 2014; Placencia *et al.*, 1992; Hildenbrand *et al.*, 2012).

La etiología de la epilepsia está asociada principalmente a traumatismos craneoencefálicos, infecciones del sistema nervioso central (SNC) (malaria, meningitis, neurocisticercosis y toxoplasmosis), tumores cerebrales, fiebres mal controladas, defectos genéticos y en su mayoría es por causas idiopáticas (60 al 70 % de los casos). Las crisis convulsivas se pueden desarrollar a cualquier edad afectando principalmente a la población infantil de los 0-1 años y a las personas de la tercera edad (personas mayores de 65 años). Dicha afección se manifiesta por igual en ambos géneros; así mismo, se observa una mayor prevalencia en personas

de bajos recursos debido a que la incidencia de traumatismos y exposición a infecciones es mayor; además el acceso a un tratamiento farmacológico es limitado para la mayoría de los pacientes (Czapinski *et al.*, 2005; Somme *et al.*, 2013).

Las crisis convulsivas se clasifican como crisis generalizadas, crisis focales, o como de origen desconocido. Las crisis generalizadas surgen e involucran rápidamente a redes neuronales distribuidas de forma bilateral, esto es, la actividad anormal inicia en ambos hemisferios cerebrales simultáneamente, por ejemplo: las crisis de ausencia, epilepsia con convulsiones tónico-clónicas, el síndrome de West, entre otros. En cambio, las crisis focales se originan en redes limitadas a un hemisferio; es decir, la actividad neuronal anormal se mantiene restringida en una región localizada en el cerebro: las auras, la epilepsia de lóbulo temporal (ELT), la epilepsia de lóbulo frontal, parietal u occipital son algunos ejemplos. Cabe mencionar que las crisis focales pueden evolucionar a crisis generalizadas. Por otro lado, las crisis desconocidas han sido clasificadas de esta manera debido a la evidencia insuficiente para clasificarlas como focales, generalizadas o ambas: los espasmos epilépticos están dentro de este grupo (Berg *et al.*, 2010).

La ELT es el tipo de epilepsia focal más frecuente y afecta aproximadamente al 40 % de los pacientes, se caracteriza por presentar crisis focales complejas y generalizadas, con tendencia a producir múltiples focos epilépticos. Las crisis surgen de las estructuras del lóbulo temporal mesial (amígdala e hipocampo), pueden llegar a ser progresivas y con frecuencia no se observa respuesta al tratamiento farmacológico de manera adecuada. La ELT se caracteriza por crisis convulsivas recurrentes, hiperexcitabilidad neuronal y pérdida selectiva de ciertas poblaciones neuronales en el hipocampo (Jerome, 2001; Shinnar, 2003; French *et al.*, 2004; Thom *et al.*, 2005).

La ELT se puede reproducir en animales de laboratorio (principalmente roedores) administrándoles vía sistémica o intracerebral un agente convulsivo como por ejemplo un glutamatérgico (ácido kaínico) o un agonista colinérgico (pilocarpina) (Covolan *et al.*, 2000).

2.2 Tratamiento farmacológico para la epilepsia

Cuando un paciente es diagnosticado con epilepsia, el tratamiento farmacológico comienza con la administración de un solo fármaco (monoterapia), considerando principalmente el tipo de convulsiones que se presentan, edad y género, administrando gradualmente diferentes dosis hasta que las crisis convulsivas no se presenten o se alcance la dosis máxima tolerada (Lorenzo *et al.*, 2008; Bialer, 2012).

Aproximadamente el 60 % de los pacientes responden de manera exitosa al tratamiento farmacológico, disminuyendo la presencia de crisis convulsivas. Alrededor de un 20 % de personas con epilepsia necesita un reajuste al tratamiento, por lo que es recomendable añadir un nuevo fármaco anticonvulsivo hasta alcanzar la dosis eficaz de éste e ir disminuyendo lentamente la dosis del primer fármaco administrado hasta suspenderlo por completo, debiendo ser controlado este tipo de combinaciones farmacéuticas por especialistas. Por otra parte, un 20 % de pacientes no responden al tratamiento farmacológico, por lo cual, se pueden emplear otras alternativas para controlar las crisis convulsivas como la estimulación del nervio vago, estimulación cerebral profunda, estimulación del nervio trigémino, dieta cetogénica o la cirugía cerebral. En los pacientes que responden de manera efectiva al tratamiento farmacológico, se puede evaluar la probabilidad de retirar la medicación después de 2 a 5 años de tener control sobre las crisis convulsivas, además de evaluar el tipo de epilepsia que se padece, dado que en los casos donde las crisis han sido difíciles de controlar, se elige la opción de administrar un tratamiento por tiempo indefinido (Nabbout *et al.*, 2007; OMS, 2014).

Los principales problemas para el acceso a un adecuado tratamiento farmacológico son la disponibilidad de los distintos FAE's en el sector salud y los costos de los medicamentos; esto conlleva a que los fármacos de primera elección sean principalmente fenobarbital, fenitoína, carbamazepina y valproato, para la región de Latinoamérica y el Caribe. En cambio, en México algunos de los medicamentos adicionales a los ya mencionados que están disponibles en el sector

de salud pública son la lamotrigina, gabapentina, oxycarbamazepina y topiramato (ILAE, 2008).

2.3 Fármacos anticonvulsivos (FAE's)

Un fármaco anticonvulsivo (FAE) ideal para el uso clínico debe de ser eficaz, presentar una farmacocinética sencilla, no unirse a proteínas plasmáticas, no generar metabolitos secundarios para evitar interacciones con otros FAE's o fármacos en general, ser soluble en agua, presentar baja toxicidad en relación con la dosis que se administra y uno de los puntos más importantes, tener un mecanismo de acción bien definido y conocido (Raspall-Chaure *et al.*, 2008). En la actualidad, los FAE's que se administran están muy lejos de presentar un perfil de un anticonvulsivo ideal, por lo cual es importante conocer su perfil tanto químico como farmacológico en su totalidad (Nabbout *et al.*, 2007; Patsalos *et al.*, 2008).

Existen más de 20 FAE's aprobados por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos por sus siglas en inglés) para su uso en humanos, los cuales se han clasificado en tres generaciones (Tabla 1). La primera generación de FAE's se caracteriza por las benzodiazepinas, moléculas altamente liposolubles que se unen fácilmente a receptores específicos. Estos FAE's tienen como ventaja que su eficacia es conocida y son de bajo costo, pero causan inhibición enzimática y llegan a presentar interacción con otros fármacos de amplio uso. En cambio, los de segunda y tercera generación presentan eficacia similar a los clásicos, principalmente en el tratamiento de epilepsias focales; como ventaja presentan la baja interacción con otros fármacos y por lo tanto un menor número de efectos secundarios. Sin embargo, la proporción de pacientes con epilepsia farmacorresistente es aún elevada, a pesar del número de fármacos anticonvulsivos disponibles (Jallon, 2004; Bialer, 2012; Hildenbrand *et al.*, 2012).

Tabla 1. Clasificación de los fármacos antiepilépticos (FAE's) por generaciones (Hildenbrand et al., 2012)

Primera generación	Segunda generación	Tercera generación
Fenobarbital	Felbamato	Lacosamida
Fenitoína	Vigabatrina	Retigabina
Primidona	Tiagabina	Brivaracetam
Carbamazepina	Oxcarbazepina	
Diazepam	Zonisamida	
Midazolam	Pregabalina	
Clonazepam	Gabapentina	
Clobazam	Levetiracetam	
Etosuximida		
Ácido valproico		

Para ejercer el efecto anticonvulsivo, los FAE's presentan diferentes mecanismos de acción, destacando la interacción con el receptor GABA_A, el bloqueo de canales dependientes de voltaje o la interacción con la proteína de vesículas sinápticas 2A (SV2A) en el caso del levetiracetam (LEV) y el brivaracetam (BRI) (Bialer, 2012).

La Figura 1 ilustra la interacción de los FAE's con su diana biológica. Los fármacos que actúan sobre los canales de sodio estabilizan la membrana neuronal, por ejemplo: carbamazepina, oxcarbazepina, fenitoína, lamotigina, felbamato y zonisamida; el valproato y el topiramato también tienen efecto sobre estos canales aunque de manera más débil. Por otro lado, los fármacos que interactúan sobre el sistema GABA lo hacen a diferentes niveles: *a) directamente sobre el receptor GABA_A*: lorazepam, diazepam, clobazam, clonazepam, primidona y fenobarbital; *b) inhibiendo la recaptación de GABA*: tiagabina; *c) inhibiendo la GABA-transaminasa*: vigabatrina; *d) actuando sobre la enzima glutamato descarboxilasa (transforma el glutamato en GABA)*: valproato y gabapentina. El topiramato y el felbamato actúan sobre el sistema glutamatérgico, uniéndose a receptores AMPA, NMDA, kainato y glicina provocando su inhibición. En cambio, la etosuximida actúa sobre los canales

de calcio tipo T. La gabapentina, lamotrigina y el topiramato ejercen su efecto al modular los canales de calcio dependientes de voltaje. Otros mecanismos de acción importantes son el que lleva a cabo la pregabalina al unirse al sitio $\alpha_2\delta$ de los canales de calcio voltaje dependientes, reduciendo la despolarización inducida por la corriente de iones calcio en la terminación nerviosa y por lo tanto, disminuyendo la liberación de neurotransmisores. Por otra parte, el LEV y el BRI se unen a la proteína SV2A para ejercer su actividad anticonvulsiva (Lorenzo *et al.*, 2008; Raspall-Chaure *et al.*, 2008).

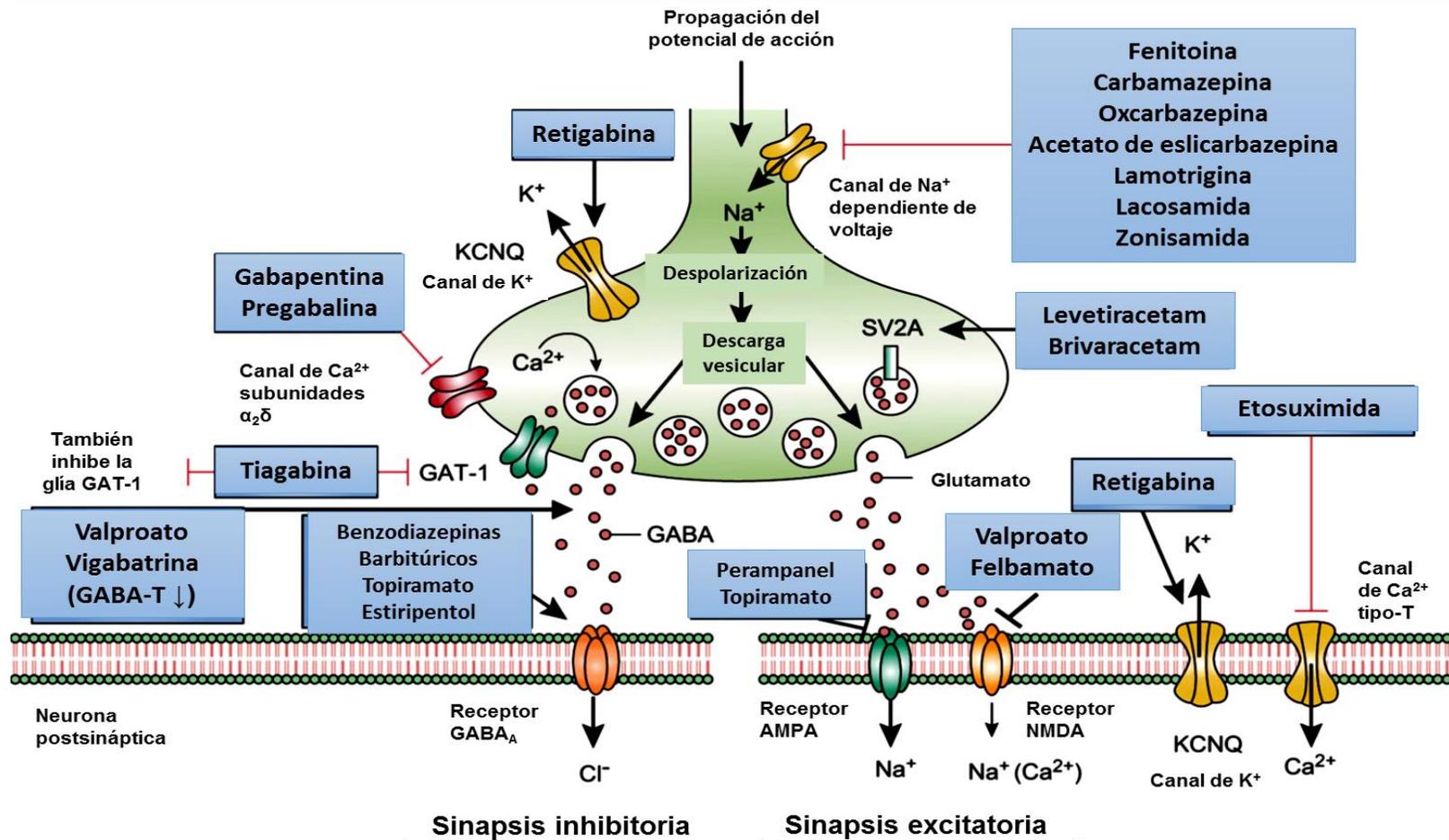


Figura 1. Principales mecanismos de acción de los fármacos anticonvulsivos. Los principales blancos farmacológicos de los FAE's son los canales dependientes de voltaje: Na⁺, Ca²⁺ y K⁺, además de la interacción con GABA_A y la interacción con la proteína SV2A. (Imagen adaptada de Löscher *et al.*, 2016).

2.4 Levetiracetam

El levetiracetam (LEV) es un fármaco anticonvulsivo de segunda generación descubierto en 1992 y aprobado por la FDA en 1999 para ser empleado en pacientes con epilepsia. Su nombre químico es [(S)-2-(2-oxopirrolidin-1-il)butanamida], derivado de la pirrolidona y estructuralmente similar al piracetam, con fórmula molecular $C_8H_{14}N_2O_2$ y un peso molecular de 170.21 g/mol (Figura 2) (Pedley y Hirano, 2003; Carreno, 2007; Kaminski *et al.*, 2009; Lyseng-Williamson, 2012).

El LEV es un FAE de amplio espectro, altamente soluble en agua y se absorbe rápidamente después de la ingesta vía oral. Se encuentra biodisponible en un porcentaje mayor al 95 % y no presenta unión a proteínas plasmáticas. Su volumen de distribución es de 0.5-0.7 L/kg, con un tiempo de vida media de 7 horas en adultos. Es eliminado totalmente por los riñones; un 66 % del total es excretado sin cambios en la orina y 24 % es metabolizado por la hidrólisis del grupo acetamida a un metabolito inactivo que posteriormente es secretado en la orina (Patsalos, 2004; Raspall-Chaure *et al.*, 2008). Se ha reportado que no es metabolizado por el hígado, por lo cual su metabolismo no se relaciona con el sistema enzimático del citocromo P-450, dando como resultado un bajo porcentaje de interacciones farmacocinéticas fármaco-fármaco (Lorenzo *et al.*, 2008).

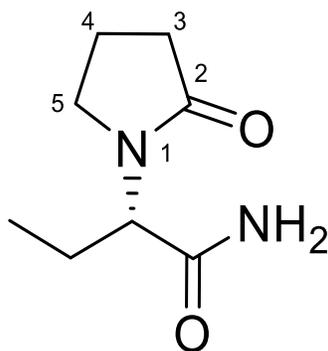


Figura 2. Estructura química del levetiracetam. Está conformada por una lactama de cinco miembros y en posición 1 (unido directamente al nitrógeno) se encuentra la n-butanamida.

Clínicamente, el LEV se administra principalmente en pacientes con crisis focales; sin embargo, se ha estudiado para ser empleado en afecciones no epilépticas, por ejemplo: trastornos de movimiento, dolor neuropático, dolores de cabeza y varias condiciones psiquiátricas (Devinsky, 1999; Rupprecht *et al.*, 2007; Lyseng-Williamson, 2012).

Varios estudios se han enfocado en la elucidación del mecanismo de acción del LEV, destacando tres blancos terapéuticos mayoritarios: la proteína SV2A, la inhibición de canales de calcio tipo N y la acción neuroreguladora sobre GABA; además de éstos, LEV también interacciona con el receptor a serotonina (5-HT), los receptores adrenérgicos α_2 y con el receptor opioide μ (Cortes-Altamirano *et al.*, 2016). Así mismo, se ha observado que este FAE actúa como el zinc y las β -carbolinas inhibiendo o activando alostéricamente a los receptores GABA_A y los de glicina (Rigo *et al.*, 2002). Sin embargo, se ha reportado que el principal mecanismo de acción del LEV involucra la unión con la proteína SV2A; modulando su actividad y afectando la fusión de las vesículas y la exocitosis de neurotransmisores, lo que se refleja en su efecto anticonvulsivo (Meehan *et al.*, 2012; Mendoza-Torreblanca *et al.*, 2013). En modelos experimentales se ha observado que el LEV no tiene efecto en las características neuronales normales, esto sugiere que ejerce una acción selectiva sobre los patrones de actividad neuronal anormal (Lyseng-Williamson, 2012).

2.5 Proteínas de vesículas sinápticas 2

Las proteínas de vesículas sinápticas 2 (SV2) son proteínas integrales de membrana expresadas en las vesículas sinápticas de núcleo denso (Bajjalieh *et al.*, 1992), aunque también están presentes en las vesículas pequeñas que contienen a los neurotransmisores. Las SV2 presentan similitud con los miembros de la familia de los transportadores de membrana y con la súperfamilia facilitadora mayor (MFS, por sus siglas en inglés) (Crèvecoeur *et al.*, 2013). Se ha reportado que se encuentran conservadas en los vertebrados, pero en los invertebrados no se ha encontrado ninguna de las isoformas (Feany *et al.*, 1992).

La familia de las SV2 está conformada por tres isoformas: SV2A, SV2B y SV2C (Bajjalieh *et al.*, 1992; Feany *et al.*, 1992; Janz *et al.*, 1999), las cuales presentan aproximadamente el 60 % de homología entre sí. Están caracterizadas por tener 12 dominios transmembranales y 3 sitios de *N*-glicosilación en el asa intravesicular (Janz *et al.*, 1999).

Varios autores han reportado que la isoforma A (SV2A) se expresa en todo el cerebro, incluyendo la corteza cerebral, el hipocampo y el cerebelo, además de estar presente en áreas como el núcleo trigeminal y en el ganglio esfenopalatino (Steinberg *et al.*, 2016); por tanto, está presente en neuronas GABAérgicas y en glutamatérgicas (Bajjalieh *et al.*, 1994). También se ha sugerido que SV2A interacciona con la proteína sensora de Ca^{2+} , sinaptotagmina-1 (SYT-1) y también modula otras proteínas reguladoras de la exocitosis (Xu y Bajjalieh, 2001; Custer *et al.*, 2006; Nowack *et al.*, 2010). La isoforma SV2B sigue un patrón de expresión similar a SV2A, con excepción del giro dentado, el globo pálido, el núcleo reticular del tálamo y la parte reticular de la sustancia nigra, por lo cual, está restringida a algunas neuronas glutamatérgicas (Bajjalieh *et al.*, 1994; Crèvecoeur *et al.*, 2013). En cambio, la isoforma SV2C, presenta una expresión más variable, ya que se encuentra en la neuraxis central incluyendo el mesencéfalo y la parte posterior del cerebro. También se puede presentar en niveles bajos en el cerebelo, los bulbos olfatorios y el hipocampo (Dardou *et al.*, 2011). Asimismo, también se encuentra en ciertos tipos celulares GABAérgicos (las células de Purkinje en el cerebelo), en neuronas dopaminérgicas y en algunas fracciones de neuronas colinérgicas (Grønborg *et al.*, 2010; Bragina *et al.*, 2012). En la tabla 2, se describen las principales características de cada una de las isoformas.

Tabla 2. Información general de las proteínas de la familia SV2 (Bartholome *et al.* 2017)

	SV2A	SV2B	SV2C
Genes	Cromosoma 3 14 371 pb	Cromosoma 7 194 369 pb	Cromosoma 13 117 984 pb
ARNm	4 334 pb 13 exones	5 307 pb 13 exones	9 101 pb 13 exones
Proteína	82 kDa 742 aa	77 kDa 683 aa	82 kDa 727 aa
Expresión	En todo el cerebro	En todo el cerebro, excepto: GD, GP, NRT y SN	Neuraxis central
Tipo de sinapsis	GA, GI	GI	GA, D y C
GD: Giro dentado; GP: globo pálido; NRT: Núcleo reticular del tálamo; SN: Sustancia nigra; GA: GABAérgica; GI: Glutamatérgica; D: Dopaminérgica; C: Colinérgica			

2.6 Proteína de vesículas sinápticas 2A (SV2A)

La proteína SV2A pesa aproximadamente 83 kDa, está formada por 742 aminoácidos. Dado que se carece de una estructura resuelta experimentalmente, en 2015 se reportó un modelo tridimensional completo de la proteína SV2A, el cual está conformado por 12 dominios transmembranales con estructura de α -hélices, un dominio intraluminal el cual contiene múltiples sitios de glicosilación (N498, N548 y N573) (Dong *et al.*, 2006; Dong *et al.*, 2008) (Figura 3); una región N-terminal relativamente larga con un sitio de unión a SYT-1 más una unión a ATP (la T84 está involucrada en la interacción entre SV2A y el dominio C2B de la SYT-1) (Zhang *et al.*, 2015) y un asa grande entre los dominios transmembranales 6-7 con otra unión a ATP en la región citoplasmática (Correa-Basurto *et al.*, 2015) (Figura 4). Esta proteína transmembranal tiene sitios reservados para la unión específica con LEV, dicha interacción está implicada en su principal mecanismo de acción (Shi *et al.*, 2011; Correa-Basurto *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2015).

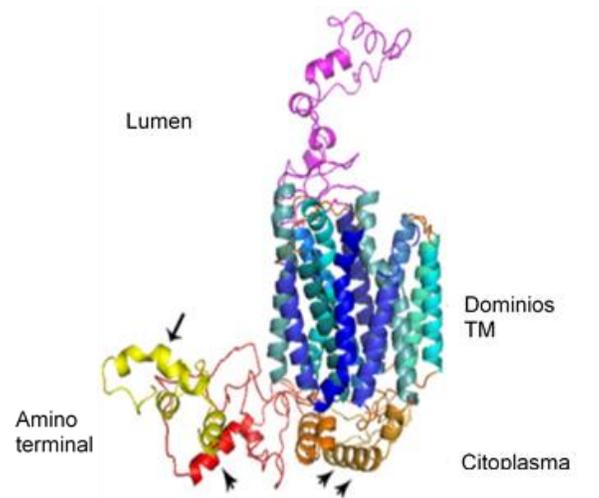


Figura 3. Modelo estructural de la proteína de vesículas sinápticas SV2A. En color magenta se representa el asa que se encuentra en el dominio intraluminal. En diferentes tonalidades de azul se observan los 12 dominios transmembranales (α -hélices). En color amarillo se observa la región N-terminal con el sitio de unión a SYT-1 y en color rojo un motivo de unión a ATP. En color marrón se observa un asa con otros motivos de unión a ATP que están entre los dominios 6-7. La región N-terminal, el sitio de unión a SYT-1 y las uniones ATP se encuentran en la parte del citoplasma (Imagen adaptada de Correa-Basurto *et al.*, 2015).

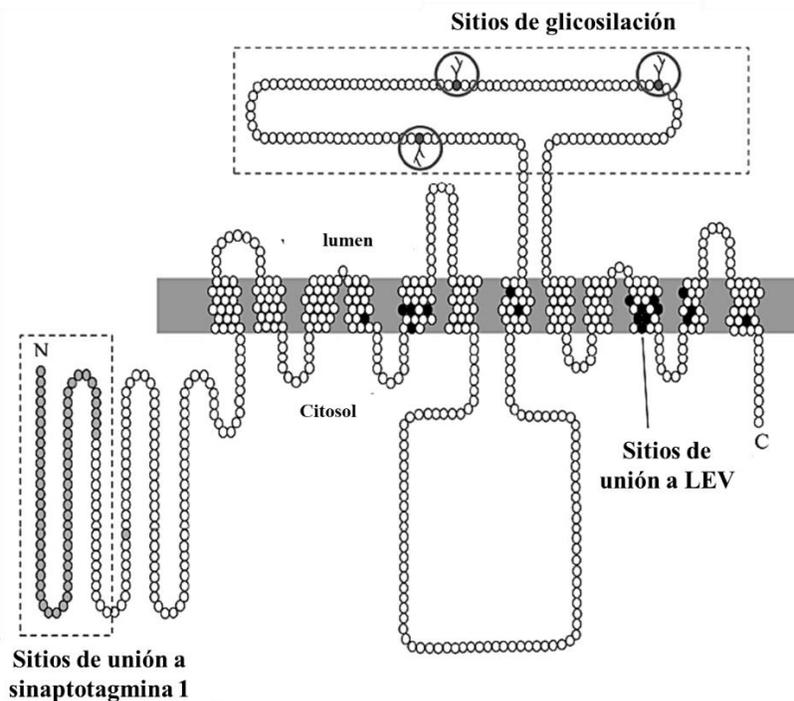


Figura 4. Estructura primaria de la proteína SV2A. SV2A está formada por 12 dominios transmembranales; un sitio de unión a SYT-1 y un asa grande entre los dominios 6 y 7, además de una región intraluminal que contiene 3 sitios de glicosilación (marcados con un círculo de color gris). En la región transmembranal se presentan los sitios de unión a LEV y sus análogos (círculos negros) (Figura adaptada de Ohno y Tokudome, 2017).

2.7 Interacción de los racetams con la proteína SV2A

En décadas pasadas, la compañía biofarmacéutica multinacional UCB (*Union Chimique Belge*, Unión Química Belga, por sus siglas en francés), descubrió una serie de compuestos activos a nivel de sistema nervioso central, los cuales han sido llamados racetams, estructuralmente similares y con un núcleo de pirrolidona. Entre los racetams desarrollados por UCB destacan el piracetam (nootrópico), UCB-30889, LEV, seletracetam (SEL) y brivaracetam (BRIV); estos últimos tres presentan actividad anticonvulsiva, aunque sólo el LEV y el BRIV se han emplean en pacientes con epilepsia (Wouters *et al.*, 2013).

Diversos estudios han tratado de esclarecer la interacción que se lleva a cabo entre los racetams y la proteína SV2A. En el 2011, usando técnicas de modelado por homología de SV2A con la proteína LacY (empleando su secuencia como templado) y mutagénesis dirigida se identificaron 14 aminoácidos que estuvieron implicados en la unión de algunos racetams con SV2A: F227, W300, Y462, K694, G303, F658, V661, I663, W666, N667, S294, M301 y G659 (Figura 4) (Shi *et al.*, 2011). Posteriormente en el 2015, empleando técnicas de modelado por homología y dinámica molecular, se determinó que los residuos identificados previamente proporcionan carácter hidrofóbico a la cavidad del canal formado por los dominios transmembranales de SV2A, esto quiere decir que son importantes las interacciones hidrofóbicas entre los racetams y los residuos. Además, se identificaron dos residuos adicionales con carácter polar: K694 y D670, y mediante estudios de mutagénesis se identificó la importancia del residuo D670, dado que si éste es mutado conduce a la pérdida total de la unión de los racetams con SV2A (Lee *et al.*, 2015).

En el mismo año, mediante estudios de dinámica y acoplamiento molecular, se corroboró que las interacciones hidrofóbicas y las uniones por puentes de hidrógeno son indispensables para el reconocimiento del ligando con el sitio de unión; adicional a esto se identificaron algunos aminoácidos por los cuales los racetams presentan preferencia: T456, S665, W666, D670 y L689 (Correa-Basurto *et al.*, 2015).

Por otra parte, en el 2014, se realizó un estudio estructura-actividad empleando el modelo del farmacóforo 3D considerando la variabilidad de sustituyentes en la posición 1 del anillo de pirrolidona de los racetams, generando diversos ligandos para SV2A (diseño basado en la estructura del compuesto activo); la modificación en las estructuras de los análogos propuestos fue el cambio del grupo butanamida en posición 1 por heterociclos de 5 y 6 miembros, observando que el grupo butanamida no es indispensable para la unión con SV2A, pero que sí es necesario tener en la posición 1 de la pirrolidona un grupo aromático que posea donadores o aceptores de puentes de hidrógeno (Mercier *et al.*, 2014).

Se han identificado 18 residuos que interaccionan con los racetams, destacando la importancia tanto de interacciones electrostáticas fuertes (puentes de hidrógeno) como de interacciones débiles (interacciones hidrofóbicas). Estructuralmente, no es necesaria la presencia del grupo amida en los racetams, pero es importante la presencia de grupos heterocíclicos que actúen como donadores o aceptores de puentes de hidrógeno y formen interacciones de tipo π - π con residuos aromáticos del sitio de unión (Shi *et al.*, 2011; Mercier *et al.*, 2014; Correa-Basurto *et al.*, 2015).

2.8 Diseño de moléculas análogas a levetiracetam

Con estos antecedentes, en el grupo de trabajo de Diseño Asistido por Computadora y Síntesis de Fármacos de la Facultad de Química (UAQ), se realizaron estudios basados en el ligando, con la finalidad de identificar otro farmacóforo de los racetams y proponer nuevas estructuras. Se analizaron 89 ligandos análogos a LEV reportados en la literatura y se construyó un nuevo modelo farmacofórico. Este modelo permitió el diseño de más de 300 estructuras nuevas, las cuales presentaron el anillo de la pirrolidona que proporciona un aceptor de puente de hidrógeno, una subestructura aromática en la posición 4 del anillo con quiralidad definida y en posición 1 una subestructura heterocíclica con capacidad de adquirir carga positiva y con donadores de puentes de hidrógeno. Realizando estudios de acoplamiento molecular de ajuste inducido, se eligieron tres moléculas, AFCE-01, AFCE-02 y AFCE-03, que presentaron mayor afinidad teórica con SV2A

que LEV. En la figura 5 se presentan los diagramas de interacción entre éstos racetams y algunos aminoácidos presentes en la proteína SV2A. Las moléculas seleccionadas tienen en posición 4 un grupo picolinamida el cual se conserva en las tres estructuras; en posición 1 se estableció un grupo diferente para cada una de las moléculas: un anillo de benzotiazol, un anillo de bencimidazol y un anillo de isoquinolina, estas modificaciones, teóricamente permiten aumentar su actividad anticonvulsiva manteniendo los beneficios del levetiracetam como fármaco anticonvulsivo, dado que presentan una mejor interacción con SV2A. Por lo tanto, en el presente trabajo, se realizó la síntesis, caracterización química y la evaluación biológica de estas tres moléculas diseñadas por métodos computacionales.

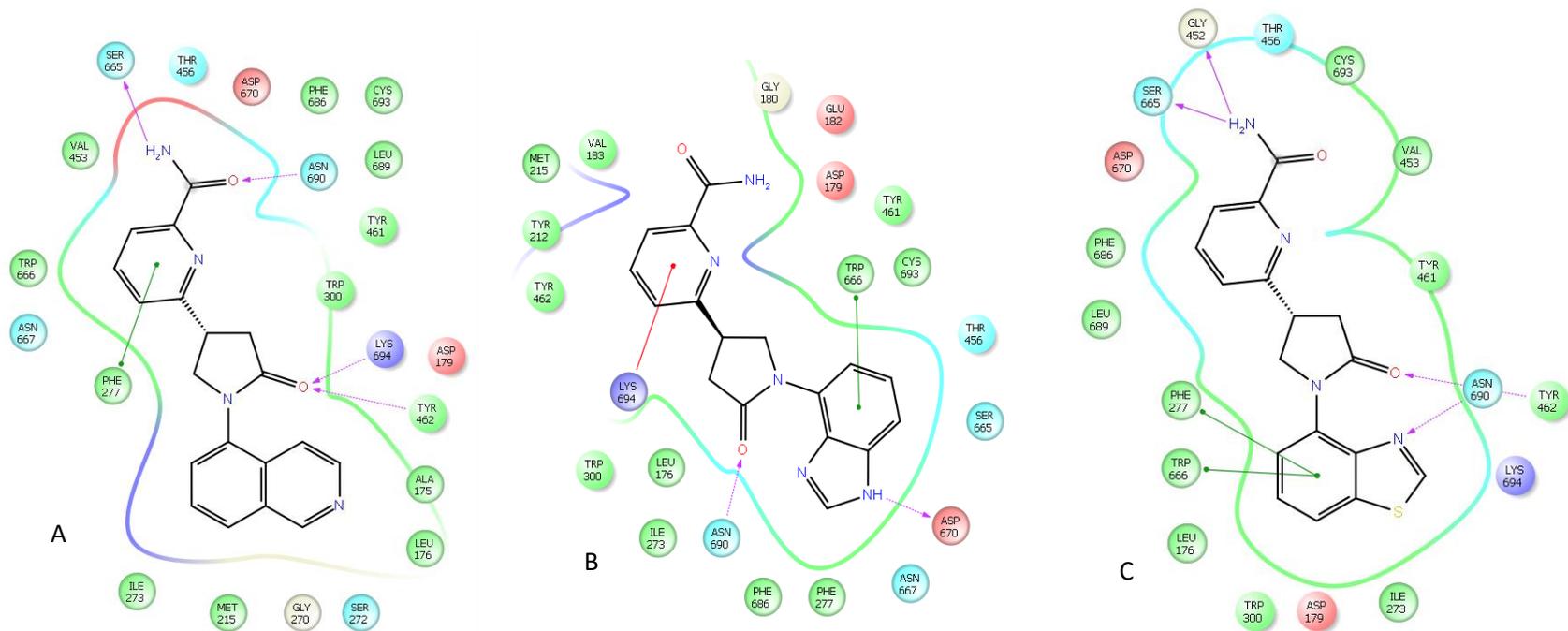


Figura 5. Interacción de los racetams con SV2A. En la imagen se muestran las interacciones que se llevan a cabo entre las diferentes moléculas diseñadas y analizadas mediante IFD (Acoplamiento molecular de ajuste inducido, por sus siglas en inglés). A) AFCE-01, esta molécula presenta interacciones por la parte de la picolinamida: S665 como donador de puentes de H, N690 como aceptor de puentes de H y F277 interacción π - π . El núcleo de la lactona interacciona con: Y462 y K694 como aceptores de puentes de H. B) AFCE-02, la picolinamida con K694 interaccionan mediante una unión π -catión. La lactona de esta molécula interacciona con N690 como aceptor de puentes de H y el anillo de bencimidazol con W666 mediante interacción π - π y con D670 como donador de puentes de hidrógeno. C) AFCE-03, G452 y S665 interaccionan como aceptores de puentes de hidrógeno con la picolinamida; la lactona interacciona como donador de puentes de H con Y462 y el anillo de benzotiazol interactúa con F277 y W666 mediante π - π y con N690 como aceptor de puentes de H.

3. JUSTIFICACIÓN

La epilepsia es el tercer trastorno neurológico que afecta del 0.5 % al 1.5 % de población en todo el mundo, sin hacer distinción entre raza, sexo, edad o estatus económico.

Existen tres generaciones de fármacos anticonvulsivos los cuales llegan a administrarse como monoterapia o en combinaciones para obtener el efecto esperado, ocasionando en algunos casos efectos adversos graves en los pacientes. Por lo que estos compuestos aún no cumplen con todas las características para ser un fármaco anticonvulsivo ideal. Sin embargo, LEV es un FAE de segunda generación, de amplio espectro, con buena biodisponibilidad, baja interacción con otros fármacos, eliminación vía renal y un mecanismo de acción único, entre otras características; lo cual lo hace un excelente fármaco para ser empleado en pacientes con epilepsia, principalmente en epilepsia de lóbulo temporal.

A pesar de ello, todavía existe cierto porcentaje de pacientes que no responden a tratamientos convencionales (incluyendo al LEV) por lo tanto, es necesario ampliar la gama de compuestos que puedan presentar efectos anticonvulsivos. A través de estudios de mutación dirigida, estudios *in silico* de la proteína SV2A y síntesis química de análogos de LEV, se han encontrado ciertas características estructurales que permiten la unión de estos compuestos con la proteína y con ello se manifiesta un efecto anticonvulsivo. El estudio de más compuestos afines a la proteína SV2A permitirá enriquecer las opciones terapéuticas enfocadas al tratamiento de la epilepsia, así como, ampliar el conocimiento de la función de esta proteína.

Por lo tanto, en el presente trabajo, se propuso la síntesis de nuevos análogos del LEV con la finalidad de tener un mayor número de moléculas con una posible actividad anticonvulsiva que servirá para ampliar las opciones farmacológicas de los pacientes con epilepsia, idealmente, incluyendo a aquellos que en la actualidad no responden a ningún tratamiento farmacológico.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Las modificaciones en la estructura de la pirrolidona, en las posiciones 1 y 4, permitirán una mejor interacción con la proteína SV2A y una mayor actividad anticonvulsiva en un modelo biológico de crisis convulsivas?

5. HIPÓTESIS

Las modificaciones estructurales realizadas a los análogos del levetiracetam (AFCE-01, AFCE-02 y AFCE-03), permitirán que las moléculas presenten una mayor actividad anticonvulsiva en el modelo animal de crisis convulsivas inducidas con litio-pilocarpina.

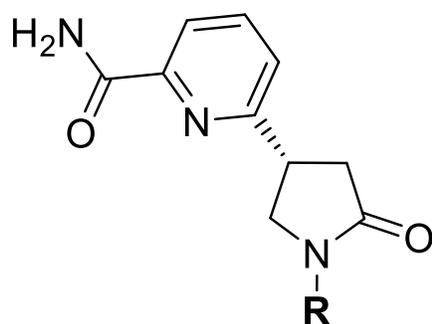
6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Sintetizar y caracterizar nuevos derivados de la pirrolidona 1,4-disustituidos y evaluar su actividad anticonvulsiva en ratas con crisis inducidas con litio-pilocarpina.

6.2 Objetivos Particulares

- 1) Sintetizar derivados 1,4-disustituidos de la pirrolidona con diferentes sustituyentes en posición 1 (R).



Molécula base

Estructura	R
AFCE-01	
AFCE-02	
AFCE-03	

Figura 6. Molécula base para la obtención de los análogos de levetiracetam, modificados en posición 1.

- 2) Caracterizar por métodos espectrométricos (EM) y espectroscópicos (RMN de ^1H y ^{13}C) las moléculas sintetizadas.
- 3) Evaluar la actividad anticonvulsiva de los análogos sintetizados en un modelo biológico de crisis convulsivas inducidas con litio-pilocarpina.

7. METODOLOGÍA

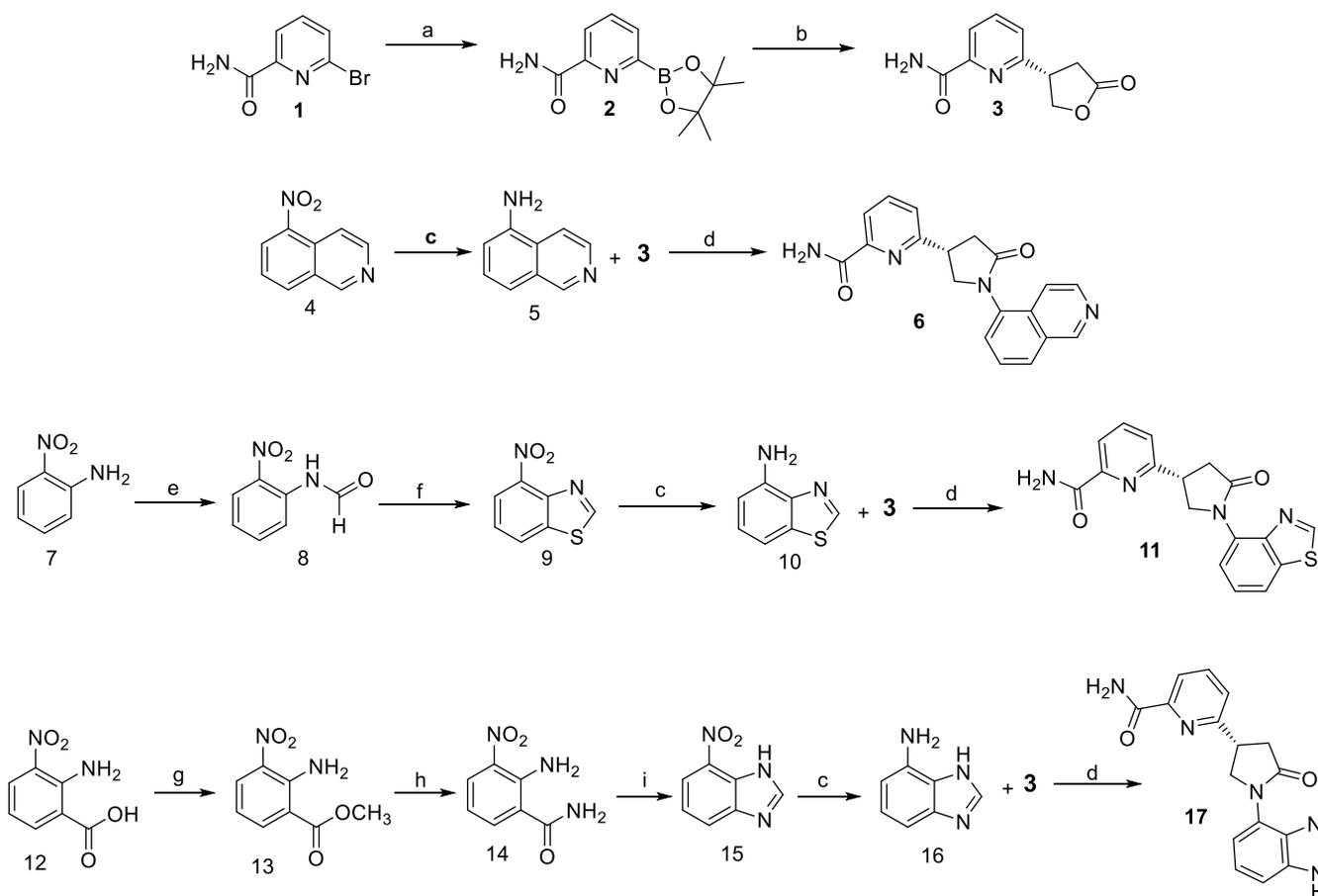
La síntesis orgánica se llevó a cabo en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, así como en el Laboratorio 122 de la Facultad de Química, Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional Autónoma de México con apoyo de la Dra. Alicia Hernández, el Dr. Rafael Castillo y el M. en C. Pedro Trejo Soto, facilitando el uso del equipo de hidrogenación.

La caracterización química de las moléculas sintetizadas se realizó en el Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencia y Nanotecnología (LINAN-Tuxtepec) en la Universidad de Papaloapan (Tuxtepec, Oaxaca) en colaboración con el Dr. Adolfo López Torres.

La evaluación biológica se realizó en el laboratorio de Neurociencias y en la Unidad de Equipos para Investigación Translacional en Modelos Animales (UEITMA) de la Torre de Investigación en el Instituto Nacional de Pediatría (INP) bajo la dirección de la Dra. Julieta Mendoza Torreblanca.

La sección experimental estuvo conformada por dos partes fundamentales: en la primera parte se describe la síntesis y caracterización química de las moléculas AFCE-01, AFCE-02 y AFCE-03, empleando las rutas de reacción mostradas en el Esquema 1. La segunda parte muestra la metodología utilizada para realizar la evaluación biológica en ratas con crisis convulsivas inducidas con litio-pilocarpina, usando como controles el LEV y el diazepam (DZP).

7.1 Síntesis orgánica y caracterización química



Esquema 1. Ruta sintética propuesta para la formación de los análogos de LEV: AFCE-01, AFCE-02 y AFCE-03. Condiciones de reacción: a) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$, $[(\text{CH}_3)_4\text{C}_2\text{O}_2\text{B}]_2$, $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$, dioxano; b) $[\text{Rh}(\mu\text{-Cl})(1,5\text{-C}_8\text{H}_{12})_2]$, (*S*)-BINAP, KOH, 2(5*H*)-furanona, tolueno: H_2O (9:1); c) CH_3OH , Pd/C 10 %, H_2 ; d) AlCl_3 , malla molecular (m.m.), tolueno; e) HCOOH 98 %, $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$; f) 1) R. Lawesson, tolueno, 2) H_2O_2 30 %, H_2SO_4 20 %; g) CH_3OH , H_2SO_4 ; h) $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, i) 1) NaClO 4 %, NaOH , 2) H_2SO_4 , HCOOH 98 %.

La serie de reacciones para la síntesis de los compuestos AFCE-01, AFCE-02 y AFCE-03, fueron reacciones de reducción, oxidación, esterificación, formilación, transposición de Hoffman, acoplamiento Suzuki-Miyaura y transamidación-ciclación.

Los reactivos empleados en las diferentes reacciones químicas fueron de grado para síntesis (grado de pureza por encima del 95 %), marca Sigma-Aldrich. Los disolventes usados en el proceso de reacción, así como en la purificación de los productos sintetizados fueron de las marcas Sigma-Aldrich y J. T. Baker.

El monitoreo del avance de reacción se realizó mediante cromatografía en capa fina, usando cromatoplasmas de gel de sílice con indicador de fluorescencia (Sigma-Aldrich), las cuales fueron reveladas con una lámpara UV-Vis a 254 nm. Las purificaciones realizadas a los diferentes compuestos fueron cristalizaciones y cromatografía en columna, usando gel de sílice (Sigma-Aldrich), con un tamaño de poro de 60 Å.

Los espectros de masas fueron obtenidos empleando el espectrometro Q-TOF con celda de colisiones CID Synapt G2-Si de la marca Waters, utilizando ESI (+) como modo de ionización. Para el análisis, se disolvieron 2 mg de cada una de las muestras en 1000 µL de MeOH grado HPLC y fueron centrifugados a 18000 g durante 10 min a 4 °C para eliminar los sólidos no disueltos, después se diluyó 20 veces la muestra (50 µL) con MeOH grado HPLC (940 µL) y 10 µL de HCOOH al 0.05 %. Las muestras fueron introducidas al equipo con un flujo de inyección de 10 µL/min. Una vez obtenidos los espectros, estos fueron analizados con base a la relación m/z (masa/carga) usando el software MassLynk.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) unidimensionales (^1H , ^{13}C y DEPT135 ^{13}C) y bidimensionales (COSY y HSQC), se obtuvieron empleando el equipo Variant modelo MR-400 MHz. Se utilizó DMSO- d_6 como disolvente. Los desplazamientos químicos (δ) se reportaron en partes por millón (ppm), las constantes de acoplamiento en Hertz (Hz) y las multiplicidades se expresaron como: singulete (s), doblete (d), doble de doble (dd), triplete (t) y

multipléte (m). Para el procesamiento de los espectros se empleó el software MestReNova.

7.2 Pruebas biológicas

7.2.1 Animales

Los animales empleados para la evaluación biológica de los compuestos sintetizados en este proyecto fueron manejados de acuerdo con la norma oficial mexicana de la secretaría de agricultura (SAGARPA, NOM-062-Z00-1999) publicada en 2001 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio” y siguiendo los reglamentos internos del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del Instituto Nacional de Pediatría (INP).

Se emplearon ratas hembra Wistar con un peso aproximado de 200-250 g, procedentes de los laboratorios Envigo. Los animales fueron alojados en el bioterio del INP en jaulas de acrílico con cama de aserrín y se les proporcionó alimento y agua *ad libitum*. Las condiciones de humedad relativa y de temperatura entre $55 \pm 5 \%$ y de $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ respectivamente, con ciclos de luz:oscuridad 12:12 horas.

Los animales fueron divididos en seis grupos experimentales de acuerdo con el compuesto a evaluar con una $n= 4$ por grupo (tabla 3).

Grupo	Compuesto a evaluar
Grupo I	Solución salina (SS)
Grupo II	Diazepam (DZP)
Grupo III	Levetiracetam (LEV)
Grupo IV	AFCE-01
Grupo V	AFCE-02
Grupo VI	AFCE-03

El grupo I fue el control positivo con respecto al desarrollo de crisis convulsivas; el grupo II (DZP) se utilizó como control negativo (por no permitir el

desarrollo de las crisis), el LEV fue el control con respecto a la actividad anticonvulsiva que se presenta entre los racetams.

7.2.2 Inducción de crisis convulsivas y administración de las moléculas sintetizadas

De manera general en la figura 7 se presenta el diagrama de experimentación para la evaluación anticonvulsiva en los diferentes grupos.

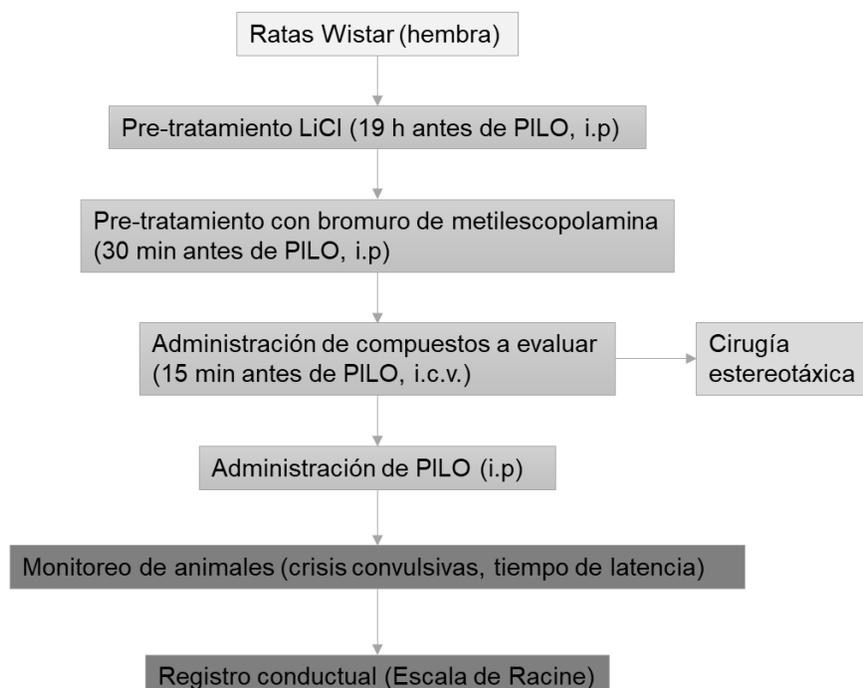


Figura 7. Diagrama de la evaluación de la actividad anticonvulsiva en los diferentes grupos experimentales, usando el modelo de inducción de crisis convulsivas con litio-pilocarpina (Li-PILO).

Las crisis convulsivas en los animales fueron inducidas a través de la administración de litio y pilocarpina (PILO). Para ello se realizó lo siguiente: 19 horas antes de la administración de PILO, se inyectó una dosis de 3 mmol/kg (127 mg/kg vía i.p.) de cloruro de litio (LiCl). Posteriormente, 30 minutos antes de la administración de la PILO, los animales fueron pretratados con bromuro de metiloscopolamina (1 mg/kg vía i.p.) con la finalidad de contrarrestar los efectos colinérgicos de la PILO. Inmediatamente, los animales fueron anestesiados con isoflurano inhalado (inducción al 4 %) en un sistema cerrado, una vez confirmada la anestesia por adormecimiento, se colocó al animal en un estereotáxico manteniendo la anestesia con isoflurano inhalado (2.5- 3 % con flujo de oxígeno de

1- 1.5 mL/min), al asegurarse la fijación de la cabeza del animal, se administró vía tópica xilocaína y después se realizó una pequeña incisión medial de 2-2.5 cm, eliminando el exceso de sangre con H₂O₂ al 4 %. Posteriormente, se identificó el Bregma (punto donde se cruzan las suturas craneales, punto 0) y se localizaron las siguientes coordenadas: AP: -1.0 mm, L: 1.5 mm y DV: 4.0 mm. Después se realizó un pequeño orificio en el cráneo para administrar vía intracerebroventricular (i.c.v.) cada uno de los compuestos de la tabla 3, 15 minutos antes de la administración de la PILO con las concentraciones que se presentan en la tabla 4, empleando una tasa de administración de 0.5 µL/min. Al término de la administración i.c.v., los animales fueron suturados dejándolos en recuperación de la anestesia y se administró la PILO (30 mg/kg vía i.p.). Concluyendo con la administración de la PILO, los animales se mantuvieron en observación, considerando que en los primeros 60 minutos después de la administración de PILO se presentan las crisis convulsivas. Los animales se mantuvieron en observación por 180 min después de la administración de la pilocarpina y se registró su comportamiento.

Tabla 4. Administración de compuestos vía i.c.v.			
Grupo	Compuesto a evaluar	Concentración	Tiempo antes de PILO
Grupo I	Solución salina (SS)	*	15 min
Grupo II	Diazepam (DZP)	5 µg/kg	15 min
Grupo III	Levetiracetam (LEV)	3 µmol/kg	15 min
Grupo IV	AFCE-01	3 µmol/kg	15 min
Grupo V	AFCE-02	3 µmol/kg	15 min
Grupo VI	AFCE-03	3 µmol/kg	15 min
* para la solución salina se administraron 3 µL			

7.2.3 Registro de crisis convulsivas

Los animales fueron monitoreados después de la administración de la PILO y el grado de las crisis convulsivas que desarrollaron se clasificó de acuerdo con la escala de Racine modificada (Tabla 5).

Tabla 5. Clasificación de crisis convulsivas, escala de Racine modificada. (Schauwecker, 2012)

Grado 0	Rigidez en la postura o inmovilidad, piloerección, excitabilidad o hiperventilación.
Grado I	Movimiento de boca, labios y lengua, movimientos de vibrisas, escalofrío y salivación
Grado II	Cola rígida, asentimiento de la cabeza, clonus facial severo
Grado III	Clonus de las extremidades anteriores, masticación, sacudida de “perro mojado”
Grado IV	Convulsiones clónicas en miembros anteriores y posteriores
Grado V	Convulsiones tónico-clónicas generalizadas asociadas con la pérdida de la postura

7.2.4 Sacrificio de animales

Una vez transcurridos los 180 min de observación, los animales fueron profundamente anestesiados con pentobarbital sódico (60-90 mg/kg de peso, vía i.p) y decapitados, sus cerebros fueron disecados y fijados en paraformaldehído (al 4%) con amortiguador de fosfatos (PB 0.1M; pH 7.4) para el análisis histológico de la correcta administración de los compuestos.

7.2.5 Variables de estudio

En la tabla 6, se muestran las variables que se consideraron en cada grupo de animales para definir la actividad convulsiva de cada compuesto evaluado.

Tabla 6. Variables de estudio a evaluar en el modelo animal de crisis convulsivas provocadas con Li-PILO

Variable de estudio	Tipo	Medición
Efecto anticonvulsivo	Cualitativo	Si/No
Intensidad de las convulsiones	Cualitativo	Escala de Racine
Tiempo de latencia	Cuantitativo	Minutos

7.2.6 Análisis estadístico

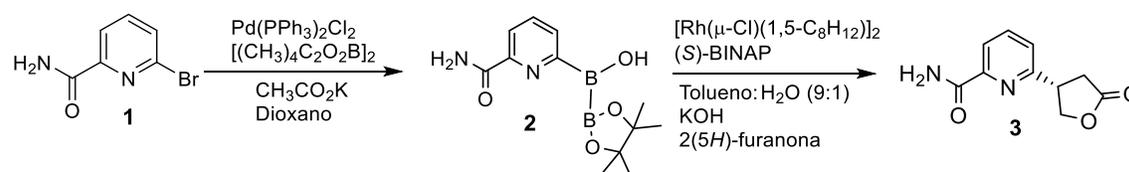
Al análisis estadístico de las diferencias entre los tiempos de latencia producidos por los compuestos evaluados en animales con crisis convulsivas inducidas con Li-PILO, se realizó mediante el uso de ANOVA una vía, seguido de la prueba *post-hoc* de Tukey, graficando la media \pm DE de cada grupo. Se aceptó como diferencia significativa un valor de p menor a 0.05. El análisis se realizó empleando el programa GraphPad Prism 6.0.

8. RESULTADOS

8.1 Síntesis orgánica

En este apartado se describen las rutas sintéticas estandarizadas para cada uno de los compuestos obtenidos en este trabajo de investigación, además de la caracterización química empleando el espectrómetro de masas Q-TOF con celda de colisiones CID Synapt G2-Si y el equipo equipo Variant para RMN. Los espectros de masas y de RMN se encuentran en el apartado de Anexos.

8.1.1 Obtención de (S)-6-(5-oxotetrahidrofuran-3-il)picolinamida

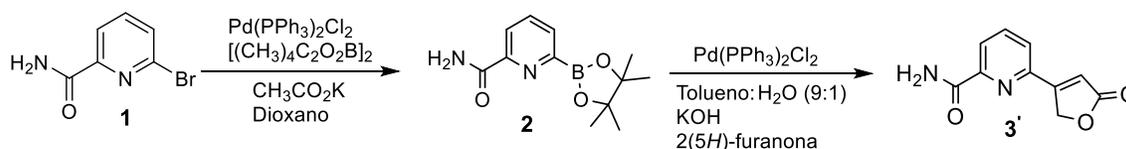


Esquema 2. Ruta sintética para obtención de (S)-6-(5-oxotetrahidrofuran-3-il)picolinamida.

La síntesis de (S)-6-(5-oxotetrahidrofuran-3-il)picolinamida se realizó mediante el acomplamiento de Suzuki-Miyaura, el cual consistió de dos pasos de reacción consecutivos. Primero, en un matraz de reacción se colocaron 1 g (5 mmol) de 6-bromopicolinamida (1), 260 mg (0.476 mmol) del catalizador diclorobis(trifenilfosfina)paladio (II), 1.45 g (5.7 mmol) de Bis(pinacolato)diboro y 1.53 g (15.6 mmol) de acetato de potasio disueltos en 20 mL de dioxano. La reacción se mantuvo con atmósfera de nitrógeno a 70-80 °C en agitación durante 18 h. Al término de la reacción se adicionaron 15 mL de CH₂Cl₂, y la solución se filtró a través de una cama de celita, para eliminar el catalizador de paladio y se realizaron lavados con 10 mL de CH₂Cl₂. Posteriormente, para eliminar las sales formadas, se realizó una extracción con agua fría (3 x 10 mL), recuperando la fase orgánica y lavando después con 15 mL de solución saturada de NaCl. La fase orgánica fue secada con Na₂SO₄ anhidro y después se concentró a sequedad para la obtención del producto 2, C₁₂H₁₈B₂N₂O₂ (276.14 g/mol), R_f = 0.4 (Hex:AcOEt; 1:1); EM ESI(+): m/z (% abundancia) = 276.1747 (49.7), 277.1692 (100) [M+H]⁺, 278.1727 (13) (Anexo 1). Sólido de color blanco en forma de aguja con un rendimiento del 83.4 %, esto es 834 mg (4.17 mmol).

Posteriormente, en un matraz se adicionaron 33 mg (0.067 mmol) del dímero cloro(1,5-ciclooctadieno)rodio (I), 20 mg (0.032 mmol) de (S)-BINAP y 20 mL de tolueno:agua (9:1) dejando en agitación durante 5 minutos con atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. Luego se agregaron a la mezcla de reacción 1.2 mL de KOH (2M) y se dejó reaccionar por 10 minutos, después se adicionó **2**, dejando reaccionar durante 5 minutos más. Finalmente se agregaron 325 μ L (4.5 mmol) de 2(5*H*)-furanona. Durante toda la reacción se conservaron las condiciones de atmósfera inerte, agitación y con una temperatura de 70 °C por 18 h. Al concluir el tiempo de reacción, la mezcla resultante se filtró a través de una cama de silica para eliminar el catalizador de rodio lavando con tolueno frío. El solvente fue lavado con solución de NaCl saturada (3 x 10 mL), una vez separadas ambas fases; la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y posteriormente se concentró a sequedad para obtener **3**, C₁₀H₁₀N₂O₃, (206.20 g/mol), R_f = 0.36 (Hex:AcOEt; 1:1), sólido blanco brillante; con un porcentaje de rendimiento del 71.7 %, es decir, 598 mg (2.99 mmol).

8.1.2 Obtención de 6-(5-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)picolinamida

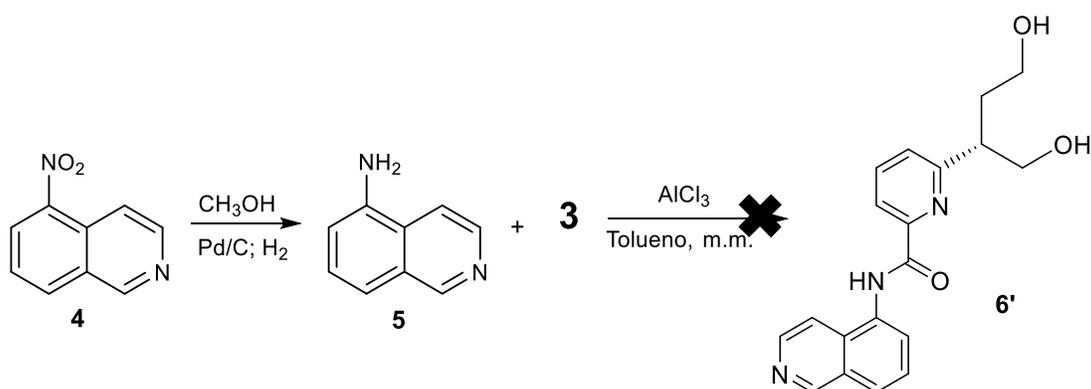


Esquema 3. Ruta sintética para obtención de 6-(5-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)picolinamida.

La síntesis de 6-(5-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)picolinamida se realizó mediante el acomplamiento de Heck, empleando para los pasos de reacción el catalizador de paladio: primeramente se llevó a cabo la formación del compuesto arilborónico como se describió en la primera parte del punto 8.1.1. Al término de la reacción se eliminó el solvente por destilación a alto vacío para obtener **2**. Inmediatamente se hizo reaccionar el producto **2** en 20 mL de tolueno:agua (9:1) para disolver el sólido, dejando en agitación durante 10 minutos con atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron a la mezcla de reacción 1.2 mL de KOH (2M) y se dejó reaccionar por 5 minutos, después se vertieron 325 μ L (4.5 mmol) de 2(5*H*)-furanona; durante toda la reacción se conservaron las condiciones de

atmósfera de nitrógeno, agitación y temperatura ambiente por 18 h. Al concluir el tiempo de reacción, la mezcla resultante fue filtrada a través de silica para eliminar el catalizador lavando con tolueno frío. El solvente fue lavado con solución de NaCl saturada (3 x 10 mL), una vez separadas ambas fases; la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y posteriormente se concentró a sequedad para obtener **3'**, C₁₀H₈N₂O₃, (204.18 g/mol), R_f = 0.30 (Hex:AcOEt; 1:1), sólido amarillo claro brillante, en formas de agujas. Se obtuvo un 53.7 % de rendimiento, equivalente a 447.8 mg (2.24 mmol).

8.1.3 Síntesis de (S)-6-(1,4-dihidroxiбутан-2-il)-N-(isoquinolin-5-il)picolinamida (AFCE-01)



Esquema 4. Ruta sintética para obtención de (S)-6-(1,4-dihidroxiбутан-2-il)-N-(isoquinolin-5-il)picolinamida (AFCE-01)

Para la síntesis del análogo AFCE-01, se llevó a cabo una reacción de reducción del grupo nitro en posición 5 de la isoquinolina para obtener la 5-aminoisoquinolina (**5**).

En un matraz de hidrogenación se adicionaron 2.9 g (16.65 mmol) de 5-nitroisoquinolina (**4**) y lentamente 260 mg de catalizador Pd/C al 10 %. Posteriormente, la mezcla fue purgada con nitrógeno (gas) y se vertieron lentamente 85 mL de MeOH, una vez disuelto el compuesto, nuevamente fue purgada la reacción y rápidamente se tapó. El matraz de reacción se puso en el equipo de hidrogenación, purgando 3 veces el sistema (carga de 2.041 atm). Posteriormente se cargó el sistema hasta una presión de 4.082 atm. En la tabla 7 se presentan las condiciones de reacción empleadas y el consumo de hidrógeno.

Tabla 7. Consumo de hidrógeno requerido para llevar a cabo la reacción de reducción de la 5-nitroisoquinolina

Presión inicial	Temperatura	Presión final	Consumo
4.082 atm	25 °C	1.905 atm	2.177 atm
4.082 atm	25 °C	3.538 atm	0.544 atm
Consumo total			2.721 atm

Una vez observado el consumo total de hidrógeno (aproximadamente 55.64 mmol), el matraz fue retirado del hidrogenador y se realizaron los lavados pertinentes con MeOH para filtrar a través de una cama de celita y así eliminar el catalizador de Pd/C, cuidando no llevar a sequedad. El solvente fue destilado a presión reducida para obtener **5**, C₉H₈N₂ (144.17 g/mol), R_f = 0.48 (MeOH:CHCl₃; 95:5); EM ESI(+): *m/z* (% abundancia): 145.0686 (100) [M+H]⁺, 146.0742 (9.7) (Anexo 2). Semisólido de color marrón, obteniendo un 97 % de rendimiento en la reacción, es decir 2.81 mg (16.13 mmol).

Para la obtención del análogo AFCE-01 (**6'**), se emplearon 700 mg (3.4 mmol) de **3** y 489.4 mg (3.4 mmol) de **5** disueltos en 25 mL de tolueno, adicionando 5 perlas de m.m. y 20 mg (0.225 mmol) de AlCl₃ anhidro. La reacción de transamidación-ciclación se llevó a cabo a una temperatura de 110 °C durante 35 horas. Posteriormente el producto de reacción fue filtrado al vacío en caliente (para evitar que el producto quedara atrapado en la resina que se forma en el matraz). El líquido obtenido se trató con carbón activado para eliminar algunos de los productos secundarios formados. Posterior a ello, el solvente se retiró por destilación a presión reducida. Después, se realizó una cristalización con etanol para obtener **6'** R_f = 0.60 (AcOEt:MeOH; 95:5), sólido naranja claro en forma de agujas con un 10.1 % de rendimiento [49.43 mg (0.344 mmol)].

Al analizar el espectro de masas se obtuvo un pico base con un valor de 202.9649 con un porcentaje de abundancia del 100 % y un pico para ión molecular [M+H]⁺ de 200.9599 con el 98 % de abundancia en relación *m/z* (Anexo 3).

Los desplazamientos de los espectros de RMN de ¹H y ¹³C (anexos 4 al 7), se presentan en las tablas 8 y 9.

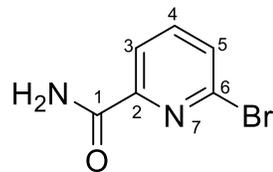


Tabla 8. Desplazamientos químicos de la molécula AFCE-01. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6).

Protón	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)	Integración
Pyr-H ₃	8.06	dd	7.5, 1.0	1
Pyr-H ₄	7.91	m	---	1
Pyr-H ₅	7.83	dd	7.9, 1.0	1
Pyr-CONH ₂	3.36	s	---	2

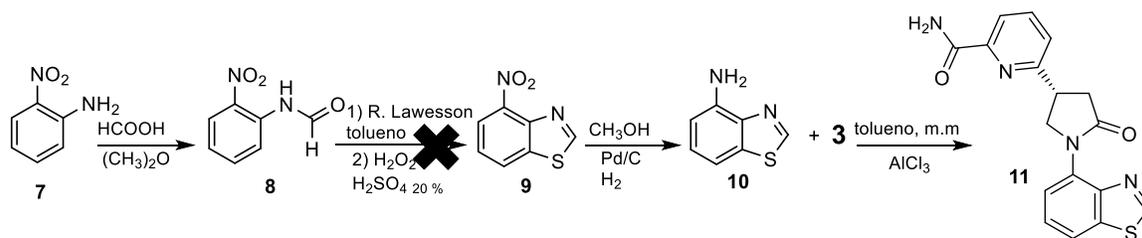
- Pyr = piridina

Tabla 9. Desplazamientos químicos de la molécula AFCE-01. RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6).

Carbono	δ (ppm)	Carbono	δ (ppm)
CONH ₂	165.01	6-C	140.57
2-C	152.10	5-C	131.26
4-C	141.30	3-C	122.02

Con el consenso de los datos analizados se elucidó la estructura de la molécula, con fórmula $\text{C}_6\text{H}_5\text{BrN}_2\text{O}$ y peso molecular de 199.95 g/mol, consistente con la estructura de la materia prima inicial.

8.1.4 Síntesis de (S)-6-(1-(benzotiazol-4-il)-5-oxopirrolidin-3-il)picolinamida (AFCE-02)

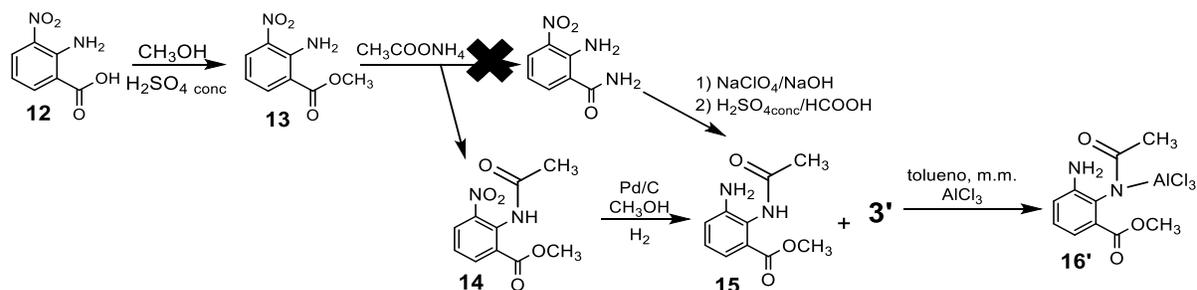


Esquema 5. Ruta sintética para obtención de (S)-6-(1-(benzotiazol-4-il)-5-oxopirrolidin-3-il)picolinamida (AFCE-02).

En un matraz de reacción, se colocaron 5 g (0.036 mol) de 2-nitroanilina (**7**) para reaccionar con 3.42 mL (0.090 mol) de HCOOH al 98 % y 4.25 mL (0.045 mol) de anhídrido acético, durante 3 h a reflujo, con atmósfera de nitrógeno y agitación constante para obtener la 2-nitroformilamida (**8**) $C_7H_6N_2O_3$ (166.13 g/mol); para la purificación de **8**, el producto se filtró al vacío y se lavó con agua fría, hasta obtener unos cristales color amarillo, con un rendimiento del 72.6 %. Posteriormente se tomaron 3 g (0.018 mol) de **8** para hacerlos reaccionar con 2.5 g (0.35 mmol) de reactivo de Lawesson (2,4-bis(4-metoxifenil)-1,3,2,4-ditiadifosfetán-2,4-ditiona), disueltos en 10 mL de tolueno, durante 3 h horas a reflujo con atmósfera de nitrógeno y en agitación. Después el producto se dejó enfriar y se adicionó lentamente en baño de hielo 5 mL (0.15 mol) de H_2O_2 al 30 % y 5 mL de H_2SO_4 al 20 % con agitación constante. Para la purificación del producto (**9**), primero se lavó con NaOH al 10% (3 x 20 mL) y posteriormente se realizaron extracciones con cloroformo, después de ello la fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro y se concentró el solvente. Al realizar el monitoreo de la reacción, se observó por CCF que la muestra no se encontraba pura. Por lo cual, el compuesto se disolvió en cloroformo y se adicionó carbón activado; después fue retirado y el solvente se concentró a alto vacío, obteniendo cristales color café oscuro brillantes, en forma de aguja, los cuales no fueron analizadas debido a que no se pudieron purificar (monitoreo con CCF), por lo cual la ruta de reacción fue modificada empleando cantidades diferentes, tiempo de reacción, temperatura, atmósfera inerte, sin poder obtener el producto **9**, debido a ello no se siguió con la ruta de reacción planteada.

Por lo tanto, se debe buscar una manera adecuada de purificación para continuar con la ruta de reacción o plantear una nueva síntesis de la molécula, considerando los parámetros modificados.

8.1.5 Síntesis (*N*-(2-amino-6-(metoxicarbonil)fenil)acetamido) cloruro de aluminio (AFCE-03)



Esquema 6. Ruta sintética para obtención de (*N*-(2-amino-6-(metoxicarbonil)fenil)acetamido) cloruro de aluminio (AFCE-03).

Para la síntesis de la molécula **16'**, se empleó como reactivo de partida el ácido 2-amino-3-nitrobenzoico, añadiendo 4 g (0.022 mol) en un matraz de reacción con 20 mL de metanol y adicionando lentamente 4 mL de ácido sulfúrico concentrado, para dejar reaccionando por 4 h en reflujo (temperatura 90-100 °C) con agitación, hasta obtener el compuesto de la reacción de esterificación (**13**); posteriormente se dejó enfriar el producto para adicionar 8.5 g (0.110 mol) de acetato de amonio y se dejar reaccionando por toda la noche, se esperaba la formación de la amida primaria en posición 1 del anillo de benceno pero dicha reacción no se llevó a cabo, dado que se vió favorecida la formación de una amida secundaria en posición 2 del anillo (compuesto **14**). El producto se llevó a sequedad, para después adicionar 20 mL de hipoclorito de sodio al 4 % y 0.330 g (0.008 mol) de NaOH, dejando en agitación hasta que la producción de gas cesara. Luego se adicionaron lentamente 2 mL de ácido sulfúrico concentrado y 10 mL de HCOOH al 98 % (en baño de hielo) dejando en reflujo durante 2 horas. Con estas condiciones se esperaba formar el anillo de bencimidazol, pero la transposición de Hoffman no se llevó a cabo debido a que en la posición 1 del anillo de benceno estaba un éster y no una amida, por lo tanto, se prosiguió a lavar el producto con agua fría para llevarlo a sequedad usando filtración al vacío. Después de esto se realizó la

reducción del grupo nitro de la posición 3, empleando la condiciones descritas en el punto 8.1.3, para obtener **15**, purificando el producto mediante cristalizaciones con etanol. A continuación, en un matraz de reacción se adicionó 1 mol de **15** con respecto de **3'** para obtener **16'**, empleando tolueno como solvente y perlas de malla molecular, dejando reaccionar por 35 h a temperatura de 110 °C con atmósfera inerte. Para la purificación del producto se empleó cromatografía en columna (de gel de sílice), usando como eluyente cloroformo y recolectando 20 fracciones (3 mL c/u), recuperando el compuesto en las fracciones 2,3 y 4: **16'** C₁₀H₁₁AlCl₃ON₂O₃ (340.5405 g/mol), R_f = 0.45 (CHCl₃:Hex; 8:2); EM (masa exacta = 338.9651); ESI(+): *m/z* (% abundancia) = 338.3552 (100) pico base, 339.3488 (55) [M+H]⁺, 340.3550 (19) (Anexo 8). El compuesto **16'** fue recristalizado en etanol, recuperando un sólido de color amarillo en forma de agujas con un porcentaje de rendimiento del 40 %.

Los desplazamientos químicos de RMN se encuentran reportados en las tablas 10 y 11 (los espectros de ¹H y ¹³C, se pueden consultar en Anexos del 9 al 13).

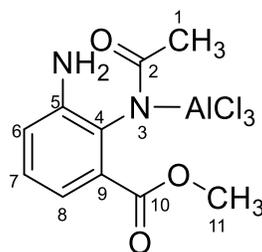


Tabla 10. Desplazamientos químicos de la molécula AFCE-03. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆).

Protón	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)	Integración
Ar-H ₈	8.30	m	---	1
Ar-H ₇	8.15	dd	7.7, 1.0	1
Ar-H ₆	6.70	t	9 orto	1
Ar-NH ₂	4.98	s	---	2
COOCH ₃	3.81	s	---	3
R-NCOCH ₃	2.08	s	---	3

- Ar = anillo aromático

Tabla 11. Desplazamientos químicos de la molécula AFCE-03. RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆).

Carbono	δ (ppm)	Carbono	δ (ppm)
10-C	206.97	8-C	132.50
2-C	167.25	6-C	114.57
5-C	146.73	9-C	114.27
7-C	139.73	11-C	52.81
4-C	133.08	1-C	31.12

En general, los porcentajes de rendimiento obtenidos para los intermediarios de reacción, así como para los productos finales de la síntesis orgánica, fueron de bajos a considerables, en la tabla 12 se presenta de manera resumida los resultados para los compuestos sintetizados.

Tabla 12. Resumen de las moléculas sintetizadas

Clave	Fórmula química	Características morfológicas	Rendimiento
AFCE-01	C ₆ H ₅ BrN ₂ O	Cristales en forma de aguja de color naranja claro	10.1 %
AFCE-02	*	*	*
AFCE-03	C ₁₀ H ₁₁ AlCl ₃ ON ₂ O ₃	Cristales en forma de aguja de color amarillo claro	40 %

*No se obtuvo el producto de reacción

8.2 Evaluación biológica

Para la determinación del efecto anticonvulsivo se eligió el modelo biológico de crisis convulsivas agudas, generadas por el quimioconvulsivante pilocarpina.

Para ello, se emplearon ratas hembras Wistar, las cuales fueron divididas aleatoriamente en 5 grupos (el grupo correspondiente a la molécula AFCE-02 se descartó debido a que no se sintetizó el compuesto).

Se utilizó una dosis única para cada uno de los compuestos evaluados: SS, DZP (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$); LEV, AFCE-01 y AFCE-03 (3 $\mu\text{mol}/\text{kg}$), administrados por vía i.c.v. Se evaluó en cada grupo, el efecto anticonvulsivo, el tiempo de latencia de las crisis convulsivas y la intensidad de las mismas.

En la tabla 13 se presentan los resultados obtenidos para cada uno de los grupos evaluados. Los animales a los que se les administró SS desarrollaron crisis convulsivas de grado V, las cuales fueron recurrentes en un rango de 36-50 min después de la administración de PILO (i.p.). En cambio, los animales pretratados con DZP presentaron crisis características de los grados II y IV, las cuales evolucionaron a crisis del grado V después de 125 min; esto debido a que la vida media del DZP es de 120 minutos en animales. Por otra parte, los animales pretratados con LEV no desarrollaron crisis convulsivas tónico-clónicas (grado V) durante los 180 min de monitoreo después de la administración de PILO; sólo presentaron crisis de grado I y II. El comportamiento convulsivo de las ratas pretratadas con el análogo AFCE-01 se clasificó en los grados II y III de la escala de Racine, posteriormente los animales desarrollaron crisis de grado IV en un rango de 148-180 min después de la administración de PILO. Finalmente, los animales evaluados con el compuesto AFCE-03, desarrollaron crisis del grado IV y posteriormente de grado V en un tiempo no mayor a los 136 minutos después de la administración de PILO.

Tabla 13. Resultados de la evaluación biológica empleando el modelo animal de crisis convulsivas inducidas con Li-PILO		
Grupo	Efecto anticonvulsivo (Si/No)	Intensidad de las crisis convulsivas (Escala de Racine)
SS	No	Grado V: Crisis convulsivas generalizadas (pérdida de postura) (4 ratas)
DZP	Si	Grado II: Clonus facial severo (3 ratas) Grado IV: Clonus de miembros anteriores y posteriores (1 rata)
LEV	Si	Grado I: Movimientos faciales y salivación (3 ratas) Grado II: Asentimiento de cabeza (1 rata)
AFCE-01	Si	Grado II: Clonus facial severo (3 ratas) Grado III: Sacudidas de “perro mojado” (1 rata)
AFCE-03	Si	Grado IV: convulsiones de miembros anteriores y posteriores (4 animales)

Los resultados con respecto al tiempo de latencia del desarrollo de crisis convulsivas, mostraron que existe diferencia significativa entre DZP, LEV, AFCE-01 y AFCE-03 con respecto a SS; esto es, el tiempo de latencia se ve incrementado en los animales pretratados con alguno de los compuestos antes mencionados. En cambio, comparando el DZP con LEV, AFCE-01 y AFCE-03; LEV presenta mayor actividad que DZP, dado que las crisis convulsivas se desarrollan en un periodo de tiempo mayor. En cambio, analizando el LEV contra sus análogos sintetizados, observamos que, AFCE-01 no presenta diferencia significativa con respecto a LEV, en contraste, AFCE-03 presenta diferencia significativa con respecto a LEV, por lo concluimos que LEV y AFCE-01 ejercen una actividad similar. Además, entre las dos moléculas sintetizadas (AFCE-01 y AFCE-03) existe una diferencia significativa, según se observa en la figura 8.

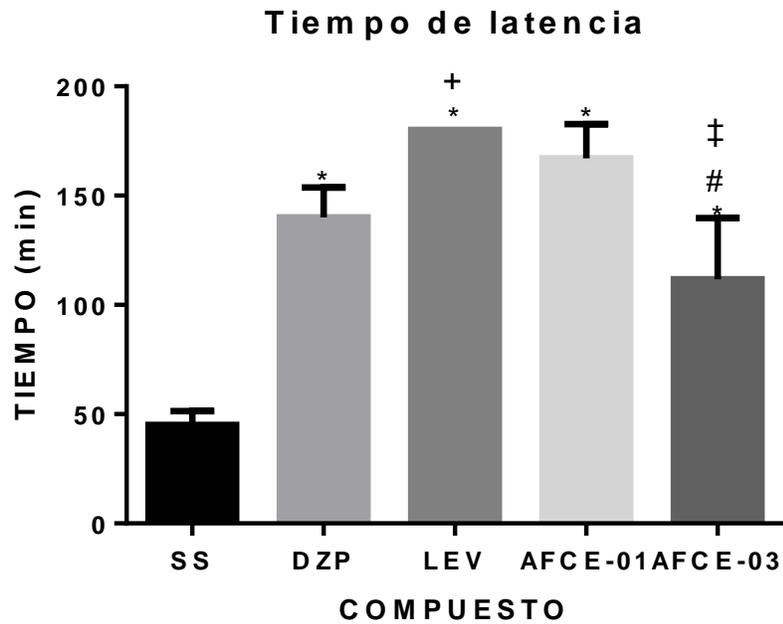


Figura 8. Tiempo de latencia para el desarrollo de crisis convulsivas administrando SS, DZP, LEV, AFCE-01 y AFCE-03 como pretratamiento vía i.c.v. en el modelo de inducción con Li-PILO. Las barras representan la media \pm DE. Comparando DZP, LEV, AFCE-01 y AFCE-03, contra SS, se presenta diferencia significativa con respecto a este grupo (*). En cambio LEV presenta diferencia significativa comparando contra DZP (+), efecto que también se observa al comparar AFCE-03 y LEV (#) y entre los análogos AFCE-01 y AFCE-03 también se presenta diferencia significativa (‡). Se empleó el análisis ANOVA de una vía seguido de la prueba *post-hoc* de Tukey, con una $n= 4$ y $p < 0.05$.

Para el análisis de la correcta administración de los compuestos evaluados, se realizaron cortes coronales de cada uno de los cerebros, usando como técnica de teñido violeta de cresilo. De esta manera se corrobora que los compuestos ejercen su actividad al irrigarse en el ventrículo del cerebro. Véase la figura 9.

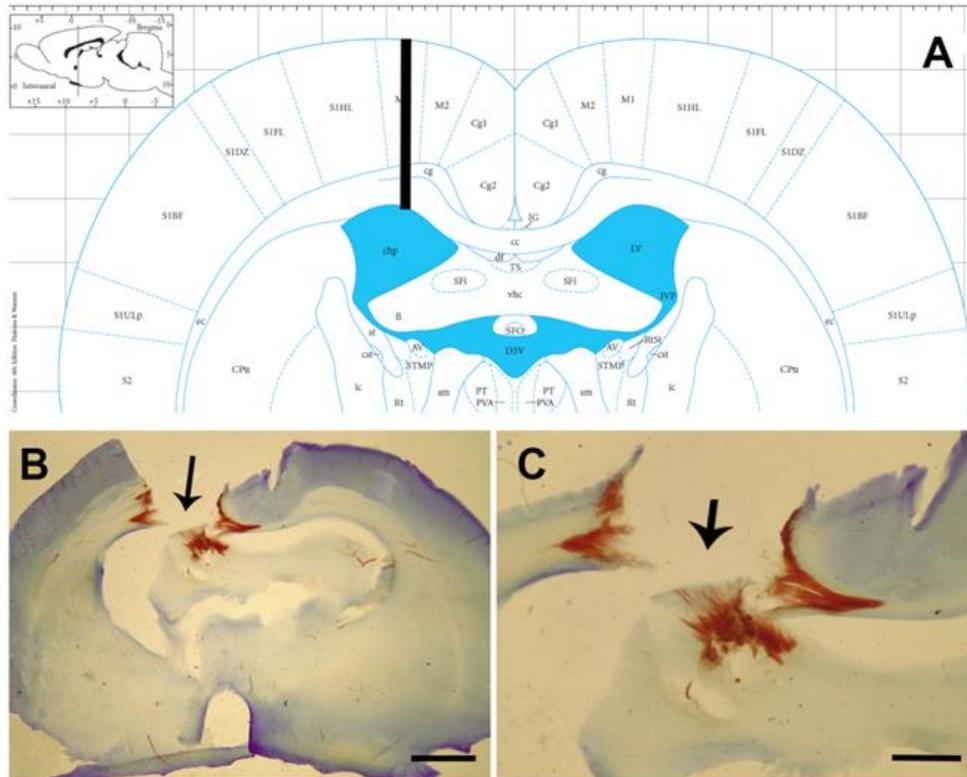


Figura 9. A) Dibujo esquemático de una sección coronal ilustrando en sitio de la inyección i.c.v. en los ventrículos laterales en las coordenadas AP: -1.0 mm, L: 1.5 mm, DV: 4.0 mm de acuerdo a Paxinos y Watson (1998). B) Fotomicrografía que representa una sección coronal con el sitio de inyección i.c.v. (flecha) Barra de calibración: 1.0 mm. C) Fotomicrografía de mayor aumento que ilustra en detalle B (cabeza de flecha). Barra de calibración 250 μ m.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este trabajo se realizó la síntesis orgánica de dos moléculas (AFCE-01 y AFCE-03), involucrando rutas sintéticas cortas y reacciones novedosas, lo cual implicó mayor complejidad en la estandarización de cada procedimiento. La caracterización estructural se realizó empleando espectrometría de masas y RMN de ^1H y ^{13}C . Además de la evaluación del efecto anticonvulsivo en un modelo agudo de crisis convulsivas inducidas con litio-pilocarpina.

Las modificaciones estructurales propuestas para las moléculas AFCE-01 y AFCE-03, se basaron en análisis computacionales previos, realizados por el grupo de trabajo del laboratorio de Diseño Asistido por Computadora y Síntesis de Fármacos, así como en el trabajo realizado por Mercier *et al.*, en el 2014, en el cual se evaluó la afinidad por SV2A, de moléculas con sustituyentes no acetamidas en posición 1 del anillo de la pirrolidona (presente en la estructura de LEV); obteniendo que los heterociclos como el imidazol, pirazol y los derivados de la piridina proveen una mejor afinidad por la proteína; por lo tanto, los grupos aromáticos aceptores o donadores de puentes de hidrógeno son importantes en la posición 1 del anillo de la pirrolidona.

Una de las reacciones empleadas en este trabajo de investigación, fue el acoplamiento de Suzuki-Miyaura, el cual es una reacción de transmetalación, para ello es necesario la formación de complejos organometálicos para obtener un enlace C-C. Este acoplamiento es dividido en dos reacciones, la reacción de Suzuki en la cual se obtienen productos organoborónicos, al igual que en la reacción de Stille, ambos acoplamientos permiten la síntesis de moléculas complejas, el acoplamiento de Stille presenta mayor selectividad que el de Suzuki; aunque para este trabajo de investigación se buscó la formación de compuestos organoborónicos sin emplear compuestos que produjeran una mayor cantidad de productos secundarios con metales, ya que en la reacción de Stille se emplean compuestos de estaño además del catalizador de paladio (Espinet y Echavarren 2004; Partyka, 2011). El compuesto arilborónico obtenido del acoplamiento de Suzuki, se emplea en un segundo paso de reacción con un catalizador de rodio (reacción de Miyaura), para

formar un enlace C-C en las moléculas. Además, empleando ligandos quirales (BINAP, SEGPHOS, P-PHOS y fosforamida, principalmente), se disminuye la obtención de mezclas racémicas; esto se ve favorecido por los complejos de coordinación formados entre el catalizador, los ligandos y el compuesto maleimida.

Los productos del acoplamiento de Suzuki-Miyaura no se obtuvieron en este trabajo de investigación, esto se puede explicar con varios factores que influyen; principalmente la atmósfera inerte que se emplea en las reacciones. Berhal *et al.*, 2011 reportó que se requiere atmósfera de argón para llevar a cabo la reacción entre compuestos arilborónicos y compuestos maleimidados; y en este trabajo se empleó atmósfera de nitrógeno. Otro de los factores importantes que influyen en este tipo de reacciones es el tiempo y las condiciones con las que se mantengan resguardados los productos arilborónicos, puesto que pueden llevar a cabo una reacción de hidrobromación. El compuesto 3' se monitoreó mediante CCF y EM para corroborar la formación del compuesto arilborónico, el cual en un primer ensayo se encontró íntegro, y conforme transcurrió el tiempo se observó su descomposición por CCF. Por lo tanto, fue necesario llevar a cabo las reacciones en secuencia para evitar la degradación de los compuestos, hasta obtener las moléculas finales, monitoreando los intermediarios de reacción con CCF y su purificación conforme se describe en la sección de resultados.

De manera paralela se realizó la reacción de Heck, para obtener el compuesto 2-furanona sustituido en posición 4, debido a que en esta reacción solo se emplea un catalizador, por lo tanto solo se debe retirar el solvente y nos genera un producto similar con una insaturación en el carbono 3, lo que provee de rigidez a la molécula. Después se llevó a cabo la reacción de transamidación-ciclación del producto de la reacción de Heck con la 5-aminoisoquinolina, obteniendo 6-(1-(isoquinolin-5-il)-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-3-il)picolinamida. El problema presentado en esta reacción es el rendimiento, se obtuvo cantidad suficiente solo para EM (Anexo 14) y no para experimentos posteriores, concluyendo que esta vía sintética no es la adecuada para las moléculas propuestas en este trabajo.

Una vez analizados los resultados de los experimentos de RMN (unidimensional y bidimensional) y el espectro de masas de los productos AFCE-01 y AFCE-03, se determinó que la estructura no coincidió con la que se planteó en un inicio; esto puede ser debido a que producto de Suzuki-Miyaura no fue estable a pesar de haber realizado una síntesis secuencial. Para la molécula AFCE-01 en el espectro de masas se obtuvo un pico a 202.9649 con un porcentaje de abundancia del 100 % y un segundo pico con un valor de 200.9599 en proporción menor, este patrón isotópico, se presenta cuando la molécula incluye bromo en su estructura. En los experimentos espectroscópicos unidimensionales (^1H , ^{13}C , DEPT ^{13}C) se observó una señal a campo bajo (165.01 ppm, región de los carbonilos) y en la región aromática se observan 5 señales, siguiendo con el análisis de carbono, en DEPT se observan 3 señales en la región aromática en la parte superior (CH/CH₃), por lo tanto 3 carbonos son cuaternarios. Los desplazamientos en protón se observaron a campo bajo en la región aromática, y un singulete a campo alto (3.3 ppm), correspondiente al sustituyente amida de la piridina. En el experimento bidimensional, HSQC, se observa la relación que existe entre los protones aromáticos y cada uno de los carbonos del anillo de la piridina, definiendo su desplazamiento y así permitiendo elucidar la estructura para la molécula AFCE-01; la cual corresponde a la 6-bromopicolinamida.

Para la molécula AFCE-03, en el espectro de masas (Anexo 8), se observó un pico de ion molecular a 339.3488 y un pico base a 338.3552. Además se presenta un dímero el cual al realizarle el experimento de ms/ms (masas/masas), se rompe para generar monómeros con los valores mencionados anteriormente. Los espectros de RMN, arrojaron como datos desplazamiento en la región carbonílica, la región aromática y alifática en ^{13}C . De acuerdo con el experimento de DEPT, se observa que se tienen en la molécula 5 carbonos cuaternarios y 5 carbonos ya sean metilos o metilenos. En ^1H se observaron desplazamientos en la región aromática y alifática. Analizando los espectros bidimensionales, COSY (Anexo 12) nos indica que hay relación entre los protones desplazados a 8.35 y 6.71 ppm y HSQC (Anexo 13), permitió la relación entre los protones aromaticos estaban relacionales con los carbonos del anillo de benceno, los cercanos al grupo éster y los cercanos al grupo

amida; en la estructura final de la molécula. Con ambos estudios (espectrométricos y espectroscópicos), se elucidó la estructura de la molécula en la cual se presenta un complejo organometálico con el cloruro de aluminio, esto debido a que la transamidación-ciclación no se llevó a cabo por completo. Aunque también se pensaba que el producto estaba contaminado con metanol puesto que las sales de aluminio pueden actuar como catalizadores para una reducción tipo Meerwein-Ponndorf-Verley en la cual, en la presencia de un alcohol, éste puede transferir un hidruro para la reducción de grupos carbonilo (Campbell *et al.*, 2001); esto fue descartado al analizar los espectros de RMN.

En los modelos biológicos, las crisis convulsivas se pueden presentar en dos tipos de animales, ya sea que estén genéticamente modificados para presentar convulsiones espontáneas recurrentes o animales normales a los cuales se les induzcan las convulsiones, ya sea por estimulación física (inducción eléctrica) o por inducción química (administración de pilocarpina o ácido kainico), para generar modelos agudos o crónicos. Ambas formas de inducción pueden generar un modelo biológico con convulsiones espontáneas recurrentes. Otro punto que se debe de tomar en consideración en los modelos biológicos, es el tipo de convulsiones que se van a provocar en los animales, debido a que la inducción física y química genera convulsiones parciales.

El LEV ha sido evaluado en diferentes modelos biológicos obteniendo efecto en el encendido de amígdala, sin mostrar efecto en modelos como el de MES y PTZ. Además este FAE presenta eficacia clínica en crisis parciales, y crisis generalizadas (convulsivas y no convulsivas) (Löscher 2011). Para evaluar la actividad anticonvulsiva de un compuesto nuevo en un modelo biológico, se debe de tomar en consideración si se evaluará al administrarse como pretratamiento o tratamiento, en que periodo del desarrollo de las crisis convulsivas; epileptogénesis o estado epiléptico. Las moléculas AFCE-01 y AFCE-03, fueron evaluadas en un modelo de crisis convulsivas inducidas con litio-pilocarpina (quimiconvulsivante), administrándose como pretratamiento, dado que la finalidad en este proyecto era sólo saber si presentarían actividad anticonvulsiva o no. Las dosis administradas en

los animales fue determinada tomando como base el estudio de Walrave *et al.*, 2015 donde emplearon por vía i.c.v. LEV evaluando su efecto en el modelo de 6 Hz. Además determinaron el tiempo de latencia, el cual se vio incrementado con respecto al control (SS).

Las moléculas AFCE-01 y AFCE-03 sintetizadas en este trabajo, presentaron efecto anticonvulsivo y aumentaron el tiempo de latencia para el desarrollo de crisis convulsivas después de administrar la PILO, la molécula AFCE-01 presentó un efecto similar al observado con el LEV, dado que las convulsiones de los animales no evolucionaron hasta grado V de la escala de Racine, esto indica que a pesar de haber actividad anormal en el cerebro, el compuesto ayuda a retardar la aparición de convulsiones. En cambio la molécula AFCE-03, arrojó resultados similares a los del diazepam. Para diferenciar la actividad anticonvulsiva entre ambas moléculas se deberían de usar dos modelos de crisis convulsivas, uno de crisis parciales y otro de crisis generalizadas, para tener mayor número de evidencias que comprueben el efecto anticonvulsivo.

Ambas moléculas estructuralmente presentan grupos donadores y aceptores de puentes de hidrógeno que podrían favorecer la interacción con la proteína SV2A. aunque las condiciones estructurales de las moléculas son totalmente diferentes a las planteadas en un inicio.

10. CONCLUSIONES

1. Se sintetizaron las moléculas AFCE-01 y AFCE-03, empleando como reacciones novedosas el acoplamiento de Suzuki-Miyaura y la reacción de transamidación-ciclación.
2. Se identificaron estructuralmente las moléculas sintetizadas, empleando espectrometría de masas usando como modo de ionización ESI (+) y RMN de ^1H y ^{13}C (unidimensional y bidimensional).
3. Las moléculas AFCE-01 y AFCE-03 presentaron actividad anticonvulsiva e incrementaron el tiempo de latencia para el desarrollo de crisis convulsivas en el modelo de crisis inducidas mediante Li-PILO.

11. PERSPECTIVAS

1. Reestructurar la ruta de síntesis para cada una de las moléculas propuestas, así como métodos de monitoreo y purificación.
2. Diseñar una nueva serie de moléculas para ser evaluadas.
3. Realizar los estudios toxicológicos pertinentes para cada molécula sintetizada.
4. Evaluar en otros modelos biológicos los compuestos sintetizados, imitando crisis generalizadas y modelos de crisis parciales. Además de evaluar el posible efecto nootrópico de estas moléculas.
5. Identificar mediante métodos computacionales los residuos de la proteína SV2A con los que interactúan AFCE-01 y AFCE-03.

12. REFERENCIAS

1. Bajjalieh SM, Peterson K, Shinghal R, Scheller RH. (1992). SV2, a brain synaptic vesicle protein homologous to bacterial transporters. *Science*, 257, 1271-3.
2. Bajjalieh SM, Frantz GD, Weimann JM, McConnell SK, Scheller RH. (1994). Differential expression of synaptic vesicle protein 2 (SV2) isoforms. *Journal of Neuroscience*, 14, 5223-35.
3. Bartholome O, Van den Ackerveken P, Sánchez Gil J, de la Brassinne Bonardeaux O, Leprince P, Franzen R, Rogister B. (2017). Puzzling out synaptic vesicle 2 family members functions. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10, 148.
4. Berg, A.T., Berkovic, S. F., Brodie, M. J., Buchhalter, J., Cross, J. H., Van Emde Boas, W., Engel, J., French, J., Glauser, T. A., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Nordli, D., Plouin, P. and Scheffer, I. E. (2010). Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*, 51(4), 676-85.
5. Berhal, F., Wu, Z., Genet, J. P., Ayad, T., & Ratovelomanana-Vidal, V. (2011). Rh-Catalyzed Asymmetric 1, 4-Addition of Arylboronic Acids to α , β -Unsaturated Ketones with DIFLUORPHOS and SYNPHOS Analogues. *The Journal of Organic Chemistry*, 76(15), 6320-6326.
6. Bialer, M. (2012). Chemical properties of antiepileptic drugs (AEDs). *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(10), 887-895.
7. Bragina, L., Fattorini, G., Giovedì, S., Melone, M., Bosco, F., Benfenati, F., Conti F. (2012). Analysis of synaptotagmin, SV2, and Rab3 expression in cortical glutamatergic and GABAergic axon terminals. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 5:32.
8. Campbell, E. J., Zhou, H., Nguyen, S.B. (2001). Catalytic Meerwein-Ponndorf-Verley Reduction by simple Aluminum complexes. *Organic Letters*, 3, 2391-2393.
9. Carreno, M. (2007) Levetiracetam. *Drugs of today (Barcelona, Spain: 1998)*, 43(11), 769-794.
10. Correa-Basurto, J., Cuevas-Hernández, R. I., Phillips-Farfán, B. V., Martínez-Archundia, M., Romo-Mancillas, A., Ramírez-Salinas, G. L., ... Mendoza-Torreblanca, J. G. (2015). Identification of the antiepileptic racetam binding site in the synaptic vesicle protein 2A by molecular dynamics and docking simulations. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 125.
11. Cortes-Altamirano, J. L., Olmos-Hernández A, Bonilla-Jaime H, Bandala C, González-Maciél A, Alfaro-Rodríguez A. (2016). Levetiracetam as an antiepileptic, neuroprotective, and hyperalgesic drug. *Neurology India*, 64, 6,1266.

12. Crèvecoeur, J., Foerch, P., Doupagne, M., Thielen, C., Vandenplas, C., Moonen, G., Rogister, B. (2013). Expression of SV2 isoforms during rodent brain development. *BMC Neuroscience*, 14(1), 87.
13. Custer, K. L., Austin, N. S., Sullivan, J. M., and Bajjalieh, S. M. (2006). Synaptic vesicle protein 2 enhances release probability at quiescent synapses. *Journal of Neuroscience*, 26, 1303–1313.
14. Czapinski, P., B. Blaszczyk, and S.J. Czuczwar. (2005). Mechanisms of Action of Antiepileptic Drugs. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 5(1), 3-14.
15. Dardou, D., Dassesse, D., Cuvelier, L., Deprez, T., De Ryck, M., and Schiffmann, S. N. (2011). Distribution of SV2C mRNA and protein expression in the mouse brain with a particular emphasis on the basal ganglia system. *Brain Res*, 1367, 130–145.
16. Devinsky, O. (1999). Patients with Refractory Seizures. *New England Journal of Medicine*, 340(20), 1565-1570.
17. Dong, M., Yeh, F., Tepp, W. H., Dean, C., Johnson, E. A., Janz, R. (2006). SV2 is the protein receptor for botulinum neurotoxin. *Science*, 312, 592–596.
18. Dong, M., Liu, H., Tepp, W. H., Johnson, E. A., Janz, R., and Chapman, E. R. (2008). Glycosylated SV2A and SV2B mediate the entry of botulinum neurotoxin e into neurons. *Molecular Biology of the Cell*, 19, 5226–5237.
19. Espinet, P., & Echavarren, A. M. (2004). The mechanisms of the Stille reaction. *Angewandte Chemie International Edition*, 43(36), 4704-4734.
20. Feany MB, Lee S, Edwards RH, Buckley KM. (1992) The synaptic vesicle protein SV2 is a novel type of transmembrane transporter. *Cell*, 70: 861-7.
21. French, J.A., Kanner AM, Bautista J, Abou-Khalil B, Browne T, Harden CL, Theodore WH, Bazil C, Stern J, Schachter SC, Bergen D, Hirtz D, Montouris GD, Nespeca M, Gidal B, Marks WJ Jr, Turk WR, Fischer JH, Bourgeois B, Wilner A, Faught RE Jr, Sachdeo RC, Beydoun A, Glauser TA. (2004). Efficacy and tolerability of the new antiepileptic drugs II: treatment of refractory epilepsy: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee and Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the American Epilepsy Society. *Neurology*, 62(8), 1261-73.
22. Grønborg, M., Pavlos, N. J., Brunk, I., Chua, J. J., Münster-Wandowski, A., Riedel, D., Jahn, R. (2010). Quantitative comparison of glutamatergic and GABAergic synaptic vesicles unveils selectivity for few proteins including MAL2, a novel synaptic vesicle protein. *Journal of Neuroscience*, 30, 2–12.

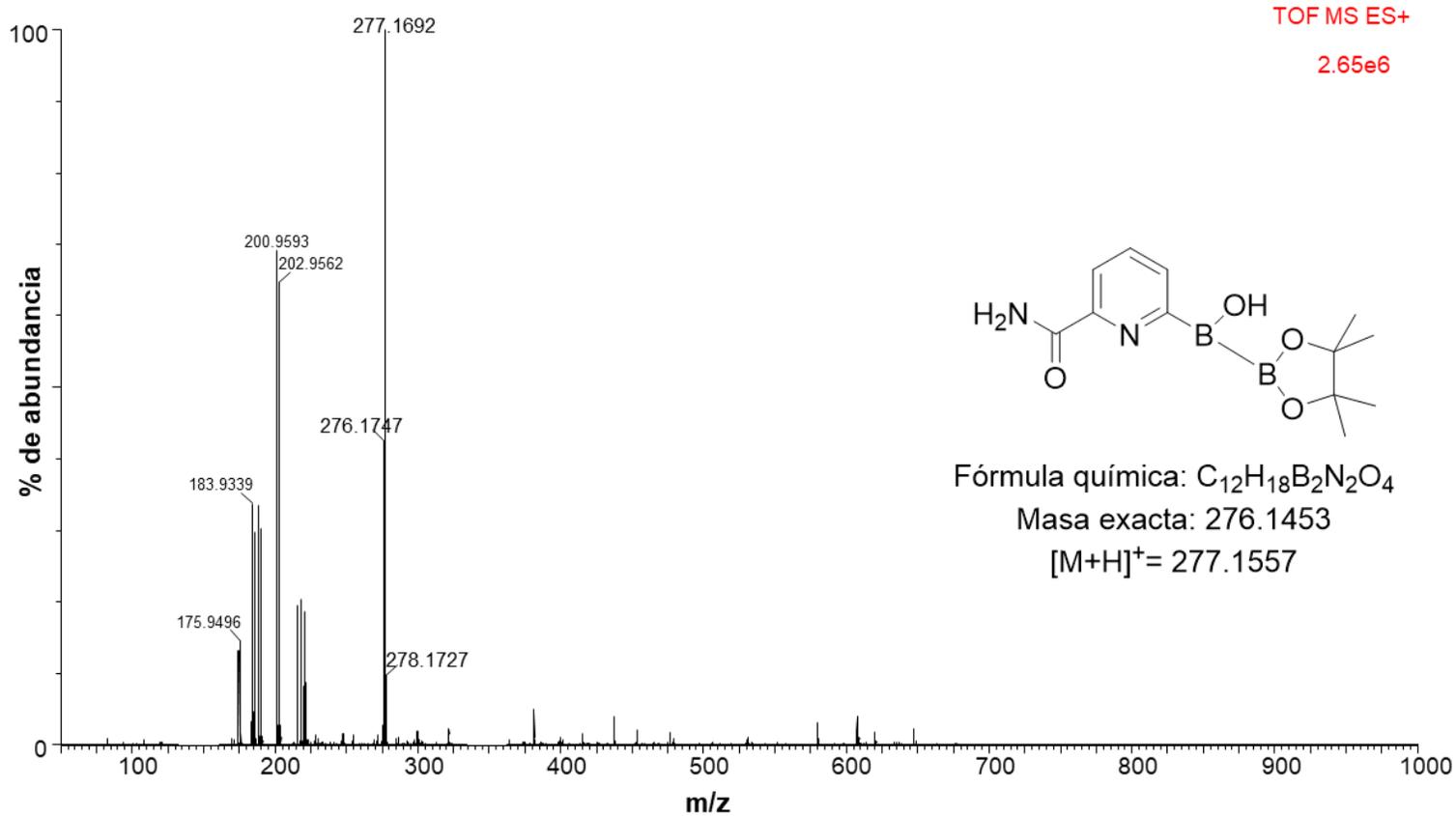
23. Hildenbrand, S., Y. Baqi, and C.E. Müller. (2012). Synthesis of tritium-labeled levetiracetam ((2S)-2-(2-oxopyrrolidin-1-yl)butanamide) with high specific activity. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 55(1), 48-51.
24. ILAE. (2008). *Reporte sobre la epilepsia en Latinoamérica y el Caribe*.
25. Jallon, P. (2004). Mortality in patients with epilepsy. *Current Opinion in Neurology*, 17(2), 141-146.
26. Janz R, Goda Y, Geppert M, Missler M, Südhof TC. (1999). SV2A and SV2B function as redundant Ca²⁺ regulators in neurotransmitter release. *Neuron*, 24, 1003-16.
27. Jerome Engel, J. (2001). Mesial Temporal Lobe Epilepsy: What Have We Learned? *The Neuroscientist*, 7(4), 340-352.
28. Kaminski, R.M. Matagne, A., Patsalos, P. N., & Klitgaard, H. (2009). Benefit of combination therapy in epilepsy: A review of the preclinical evidence with levetiracetam. *Epilepsia*, 50(3), 387-397.
29. Kim, K., & Hong, S. H. (2015). Iridium-Catalyzed Single-Step N-Substituted Lactam Synthesis from Lactones and Amines. *The Journal of Organic Chemistry*, 80(8), 4152-4156.
30. Lee, J., Daniels, V., Sands, Z. A., Lebon, F., Shi, J., & Biggin, P. C. (2015). Exploring the interaction of SV2A with racetams using homology modelling, molecular dynamics and site-directed mutagenesis. *PLoS One*, 10(2), e0116589.
31. Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasoain, I., Leza, J.C., Moro, Portolés, A. (2008). Velázquez. *Farmacología básica y clínica*. Edición Médica Panamericana. 18^oed. Buenos Aires; Madrid. XXII, 1369 pp.
32. Löscher, W. (2011). Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure*, 20(5), 359-368.
33. Löscher, W., Gillard, M., Sands, Z. A., Kaminski, R. M., & Klitgaard, H. (2016). Synaptic vesicle glycoprotein 2A ligands in the treatment of epilepsy and beyond. *CNS Drugs*, 1-23.
34. Lyseng-Williamson, K.A. (2012). Levetiracetam. *Drugs*, 71(4), 489-514.
35. Martin, R., & Buchwald, S. L. (2008). Palladium-catalyzed Suzuki–Miyaura cross-coupling reactions employing dialkylbiaryl phosphine ligands. *Accounts of chemical research*, 41(11), 1461-1473.
36. Meehan, A.L., Meehan, A. L., Yang, X., Yuan, L. L., & Rothman, S. M. (2012). Levetiracetam has an activity-dependent effect on inhibitory transmission. *Epilepsia*, 53(3), 469-476

37. Mendoza-Torreblanca, J. G., Vanoye-Carlo, A., Phillips-Farfán, B. V., Carmona-Aparicio, L., & Gómez-Lira, G. (2013). Synaptic vesicle protein 2A: basic facts and role in synaptic function. *European Journal of Neuroscience*, 38(11), 3529-3539.
38. Mercier, J., Archen, L., Bollu, V., Carré, S., Evrard, Y., Jnoff, E., & Moureau, F. (2014). Discovery of heterocyclic nonacetamide synaptic vesicle protein 2A (SV2A) ligands with single-digit nanomolar potency: opening avenues towards the first SV2A positron emission tomography (PET) ligands. *ChemMedChem*, 9(4), 693-8.
39. Nabbout, R., Baulac, S., Desguerre, I., Bahi-Buisson, N., Chiron, C., Ruberg, M., & LeGuern, E. (2007). New locus for febrile seizures with absence epilepsy on 3p and a possible modifier gene on 18p. *Neurology*, 68(17), 1374-1381.
40. Nowack, A., Yao, J., Custer, K. L., and Bajjalieh, S. M. (2010). SV2 regulates neurotransmitter release via multiple mechanisms. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 299, C960–C967.
41. Ohno, Y., & Tokudome, K. (2017). Therapeutic Role of Synaptic Vesicle Glycoprotein 2A (SV2A) in Modulating Epileptogenesis. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets*, 16, 463-471.
42. Organización Mundial de la Salud (OMS). Consultado el 15 de Octubre de 2016. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/es/>
43. Partyka, D. V. (2011). Transmetalation of unsaturated carbon nucleophiles from boron-containing species to the mid to late d-block metals of relevance to catalytic C–X coupling reactions (X= C, F, N, O, Pb, S, Se, Te). *Chemical Reviews*, 111(3), 1529-1595.
44. Patsalos, P.N. (2004). Clinical pharmacokinetics of levetiracetam. *Clinical pharmacokinetics*, 43(11), 707-724.
45. Patsalos, P. N., Berry, D. J., Bourgeois, B. F., Cloyd, J. C., Glauser, T. A., Johannessen, S. I., & Perucca, E. (2008). Antiepileptic drugs—best practice guidelines for therapeutic drug monitoring: A position paper by the subcommission on therapeutic drug monitoring, ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*, 49(7): p. 1239-1276.
46. Paxinos, G. and Watson, C. (1998). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, Cambridge, MA.
47. Pedley, T.A. and M. Hirano. (2003). Is Refractory Epilepsy Due to Genetically Determined Resistance to Antiepileptic Drugs? *New England Journal of Medicine*. 348(15), 1480-1482.

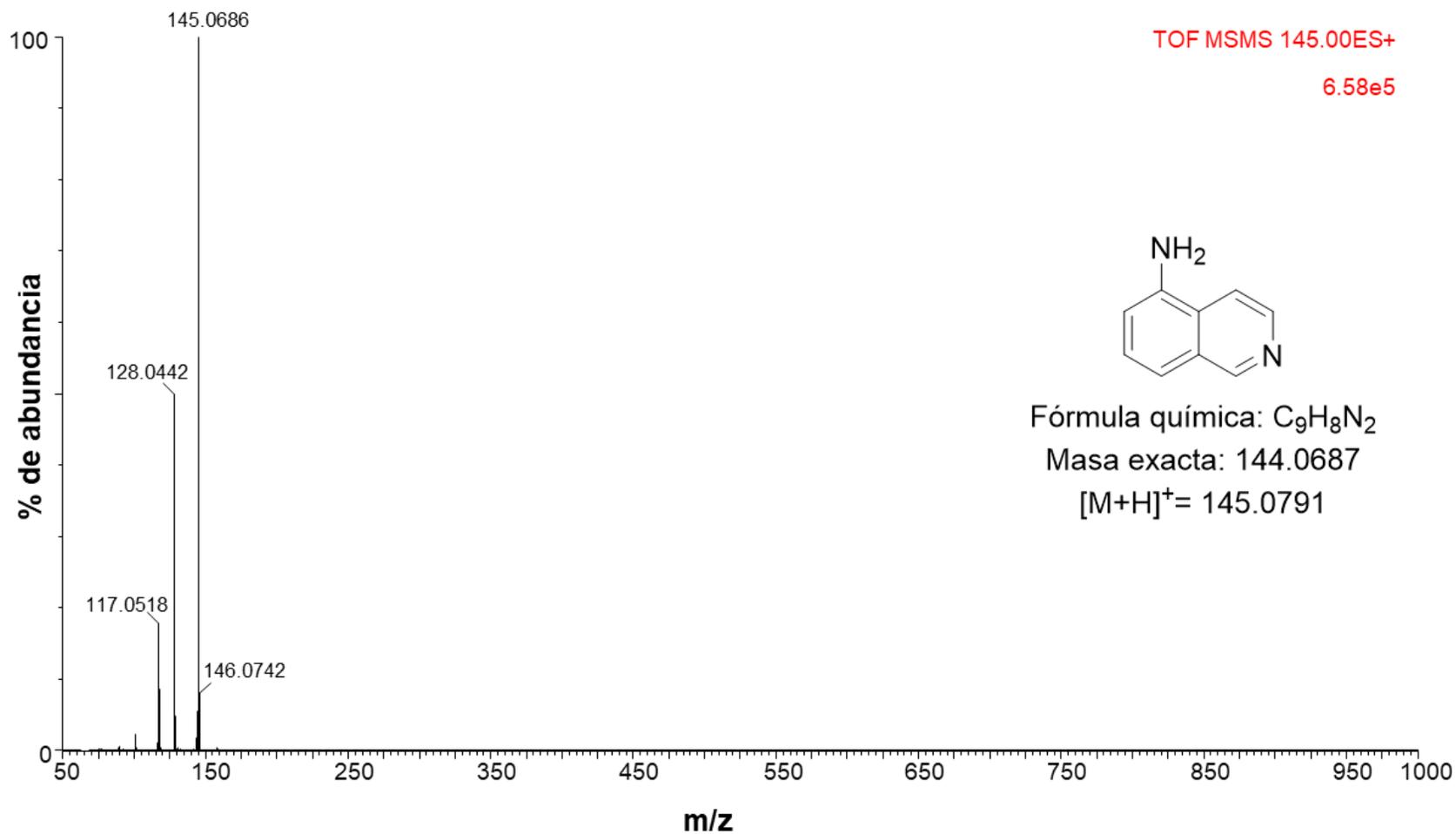
48. Placencia, M., Shorvon, S. D., Paredes, V., Bimos, C., Sander, J. W. A. S., Suarez, J., & Cascante, S. M. (1992). Epileptic seizures in an andean region of Ecuador: incidence and prevalence and regional variation. *Brain*, 115(3), 771-782.
49. Raspall-Chaure, M., B.G. Neville, and R.C. Scott. (2008). The medical management of the epilepsies in children: conceptual and practical considerations. *The Lancet Neurology*, 7(1), 57-69.
50. Rigo, J.-M., Hans, G., Nguyen, L., Rocher, V., Belachew, S., Malgrange, B., & Klitgaard, H. (2002). The anti-epileptic drug levetiracetam reverses the inhibition by negative allosteric modulators of neuronal GABA-and glycine-gated currents. *British Journal of Pharmacology*, 136 (5), 659-672.
51. Rupprecht, S., Franke, K., Fitzek, S., Witte, O. W., & Hagemann, G. (2007). Levetiracetam as a treatment option in non-convulsive status epilepticus. *Epilepsy Research*, 73(3), 238-244.
52. Schauwecker, P. E. (2012). Strain differences in seizure-induced cell death following pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurobiology of Disease*, 45(1), 297–304.
53. Shi, J., Anderson, D., Lynch, B. A., Castaigne, J. G., Foerch, P., & Lebon, F. (2011). Combining modelling and mutagenesis studies of synaptic vesicle protein 2A to identify a series of residues involved in racetam binding. *Biochemical Society Transactions*, 39(5), 1341-1347.
54. Shinnar, S. (2003). Febrile Seizures and Mesial Temporal Sclerosis. *Epilepsy Curr*, 3(4), 115-118.
55. Somme, J., Fernández-Martínez, M., Molano, A., & Jose Zarranz, J. (2013). Neuropsychiatric Symptoms in Amnesic Mild Cognitive Impairment: Increased Risk and Faster Progression to Dementia. *Current Alzheimer Research*, 10(1), 86-94.
56. Steinberg, A., Frederiksen, S. D., Blixt, F. W., Warfvinge, K., and Edvinsson, L. (2016). Expression of messenger molecules and receptors in rat and human sphenopalatine ganglion indicating therapeutic targets. *Journal of Headache and Pain*, 17, 78.
57. Thom, M., Martinian, L., Williams, G., Stoeber, K., & Sisodiya, S. M. (2005). Cell proliferation and granule cell dispersion in human hippocampal sclerosis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 64(3), 194-201.
58. Walrave, L., Maes, K., Coppens, J., Bentea, E., Van Eeckhaut, A., Massie, A., & Smolders, I. (2015). Validation of the 6Hz refractory seizure mouse model for intracerebroventricularly administered compounds. *Epilepsy research*, 115, 67-72.
59. Wouters, J., Grepioni, F., Braga, D., Kaminski, R. M., Rome, S., Aerts, L., & Quéré, L. (2013). Novel pharmaceutical compositions through co-crystallization of racetams and Li⁺ salts. *CrystEngComm*, 15(44), 8898-8902.

60. Xu, T., and Bajjalieh, S. M. (2001). SV2 modulates the size of the readily releasable pool of secretory vesicles. *Nature Cell Biology*, 3, 691–698.
61. Zhang, N., Gordon, S. L., Fritsch, M. J., Esoof, N., Campbell, D. G., Gourlay, R., & Cousin, M. A. (2015). Phosphorylation of synaptic vesicle protein 2A at Thr84 by casein kinase 1 family kinases controls the specific retrieval of synaptotagmin-1. *Journal of Neuroscience*, 35, 2492–2507.

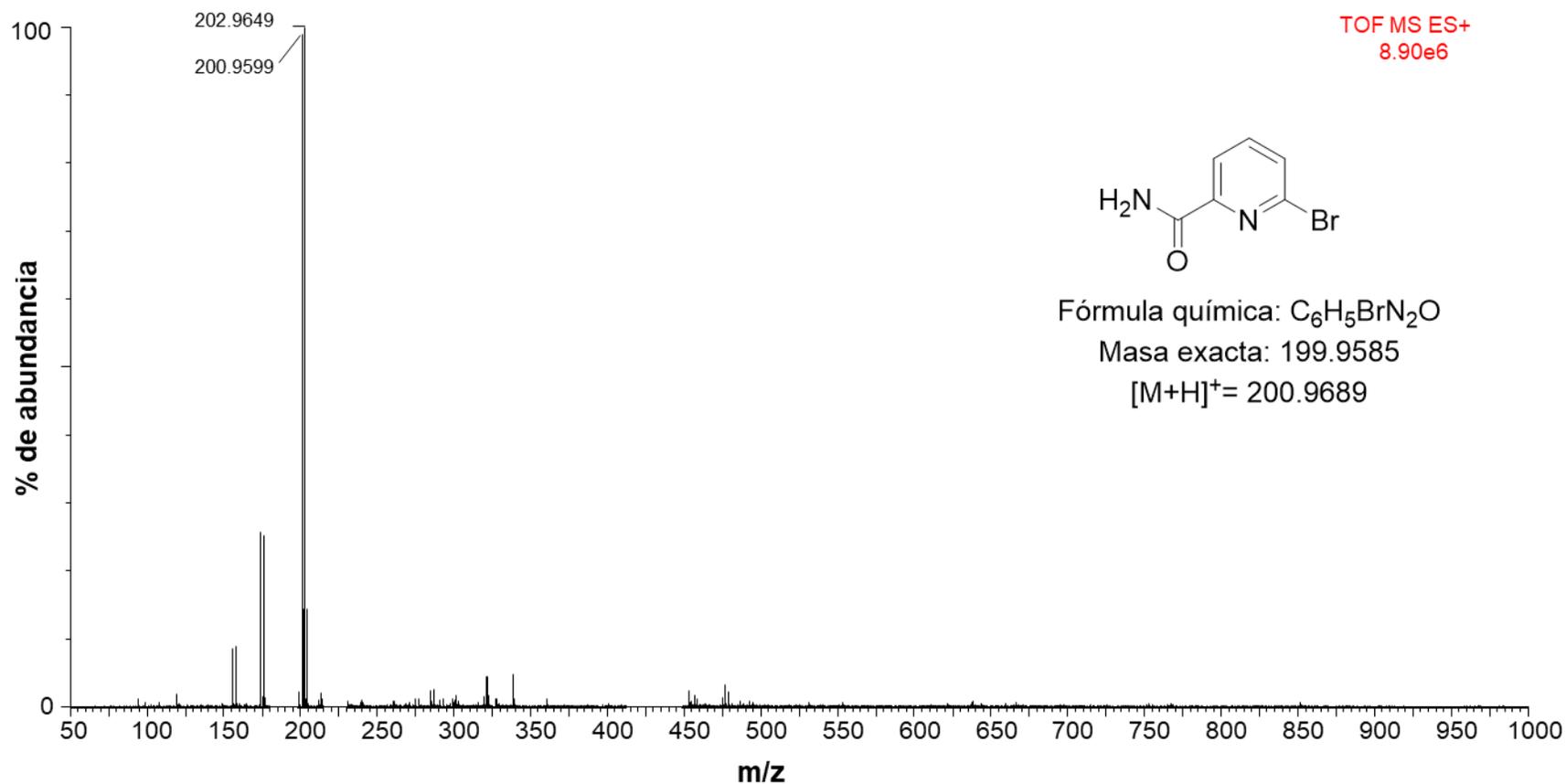
13.ANEXOS



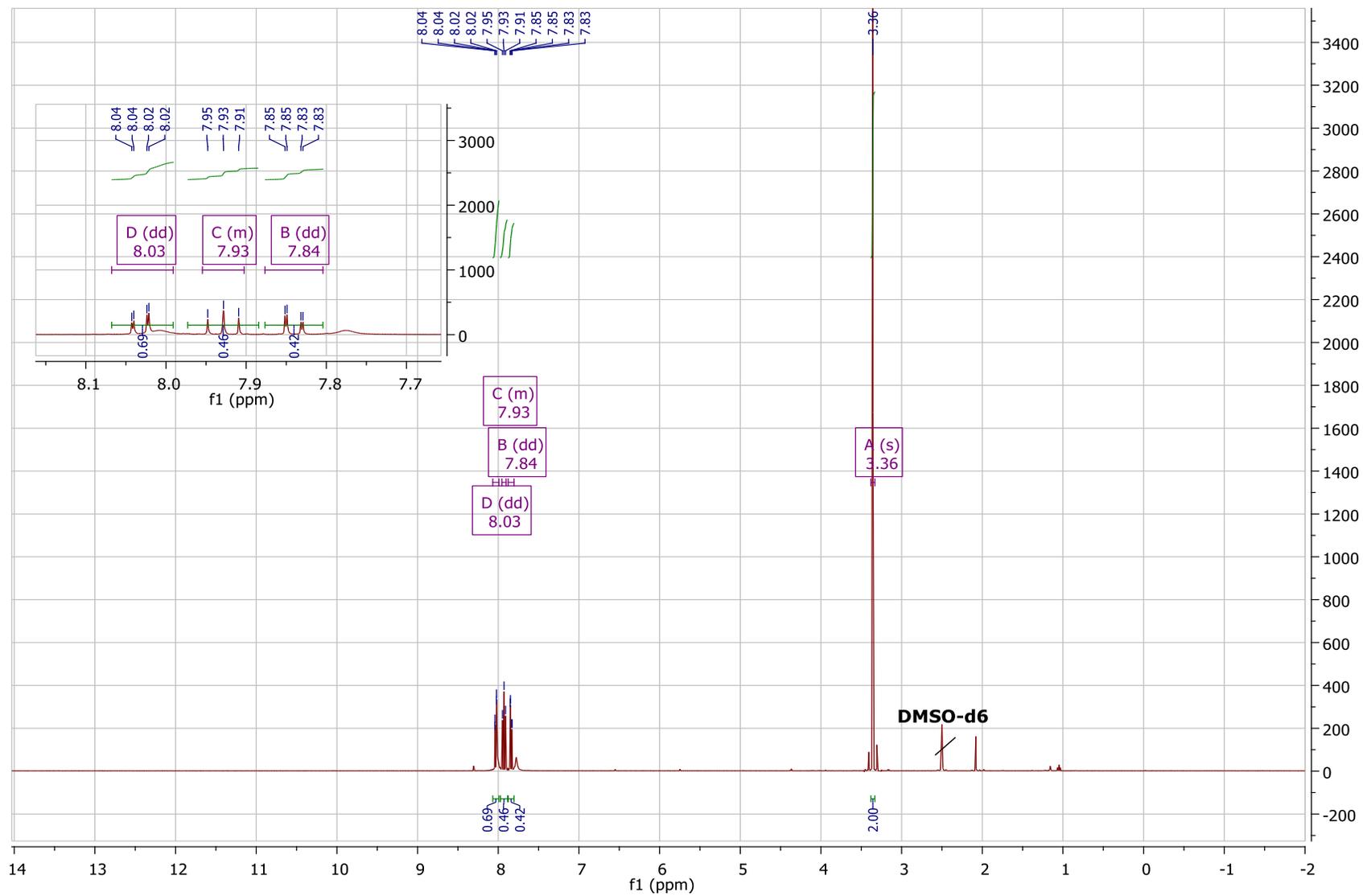
ANEXO 1. Espectro de masas de la molécula 6-(hidroxi(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)picolinamida. Intermediario del acoplamiento de Suzuki-Miyaura. Se pueden observar el ion molecular con un valor de 277.1557, una unidad más a la masa exacta calculada, la cual es de 276.1453 g/mol.



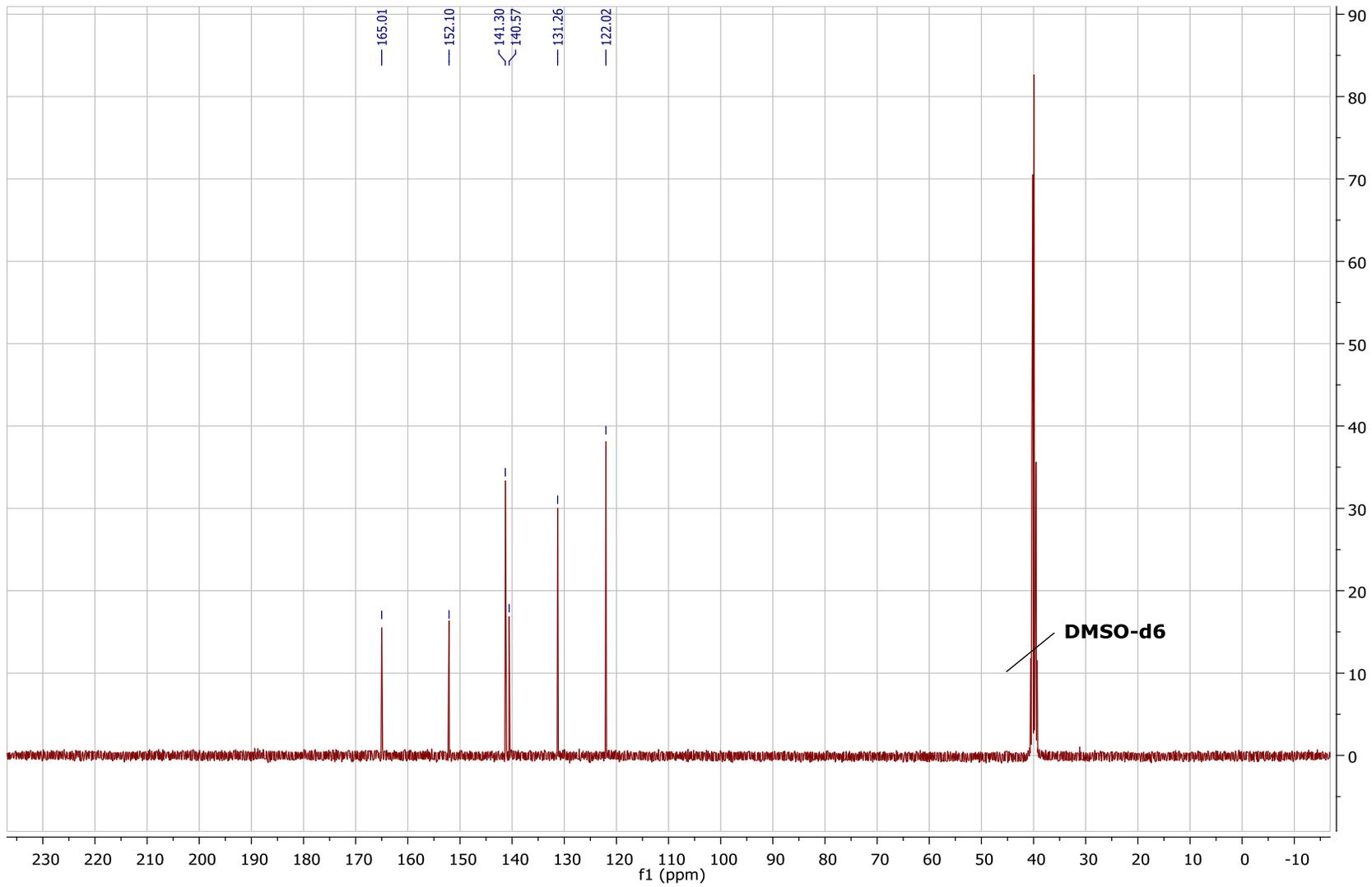
ANEXO 2. Espectro de masas de la molécula 5-aminoisoquinolina, sustituyente para la molécula AFCE-01, se calculó una masa exacta de 144.0687 g/mol, y en el espectro se observa el ion molecular con una $m/z = 145.0791$ con una abundancia del 100 %.



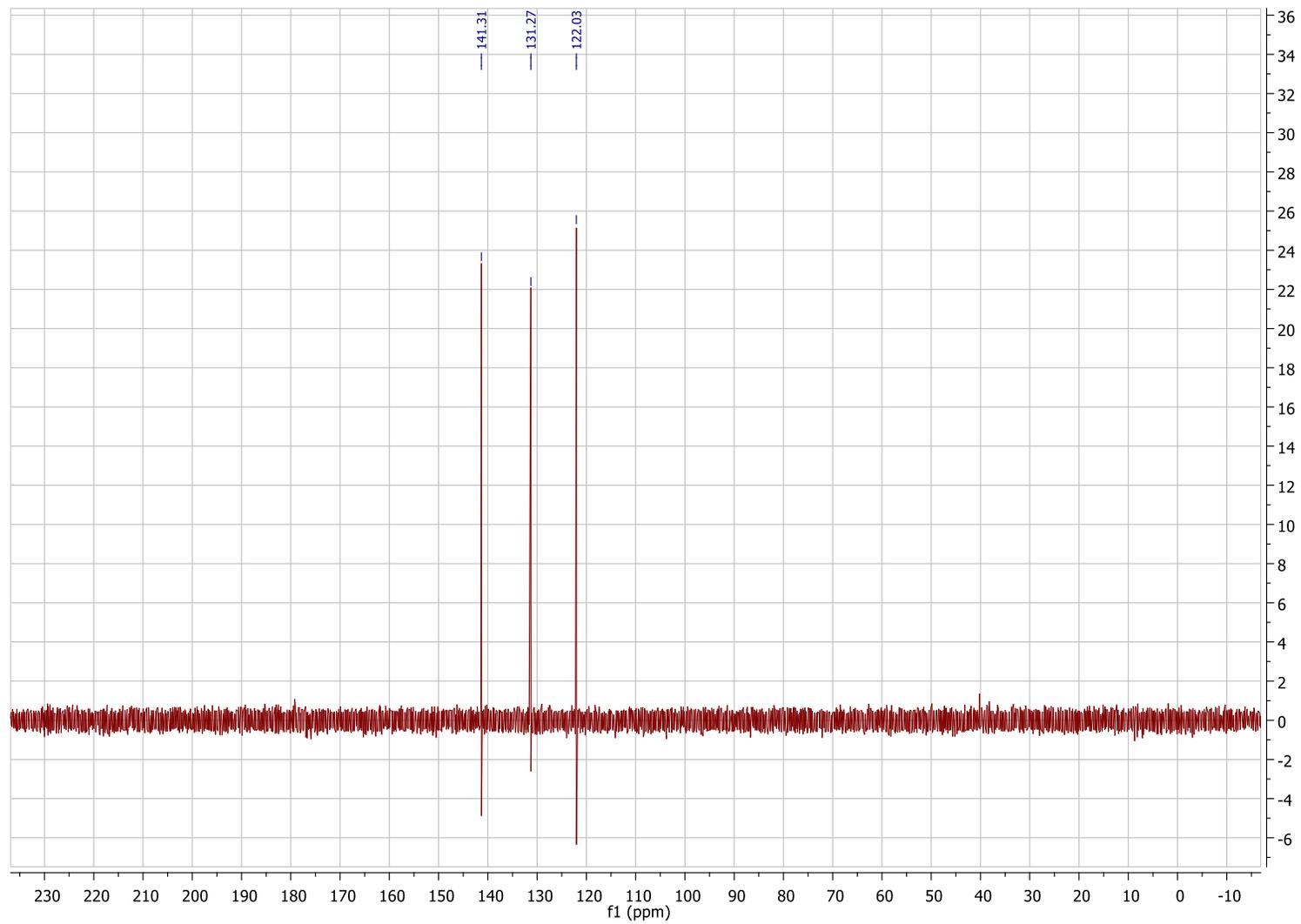
ANEXO 3. Espectro de masas de la molécula AFCE-01. Se calculó una masa exacta de 199.9585 g/mol, en el espectro se muestra el pico base en 202.9649 (*m/z*) con un 100 % de abundancia. Además se observa el patrón isotópico del bromo entre ambos picos.



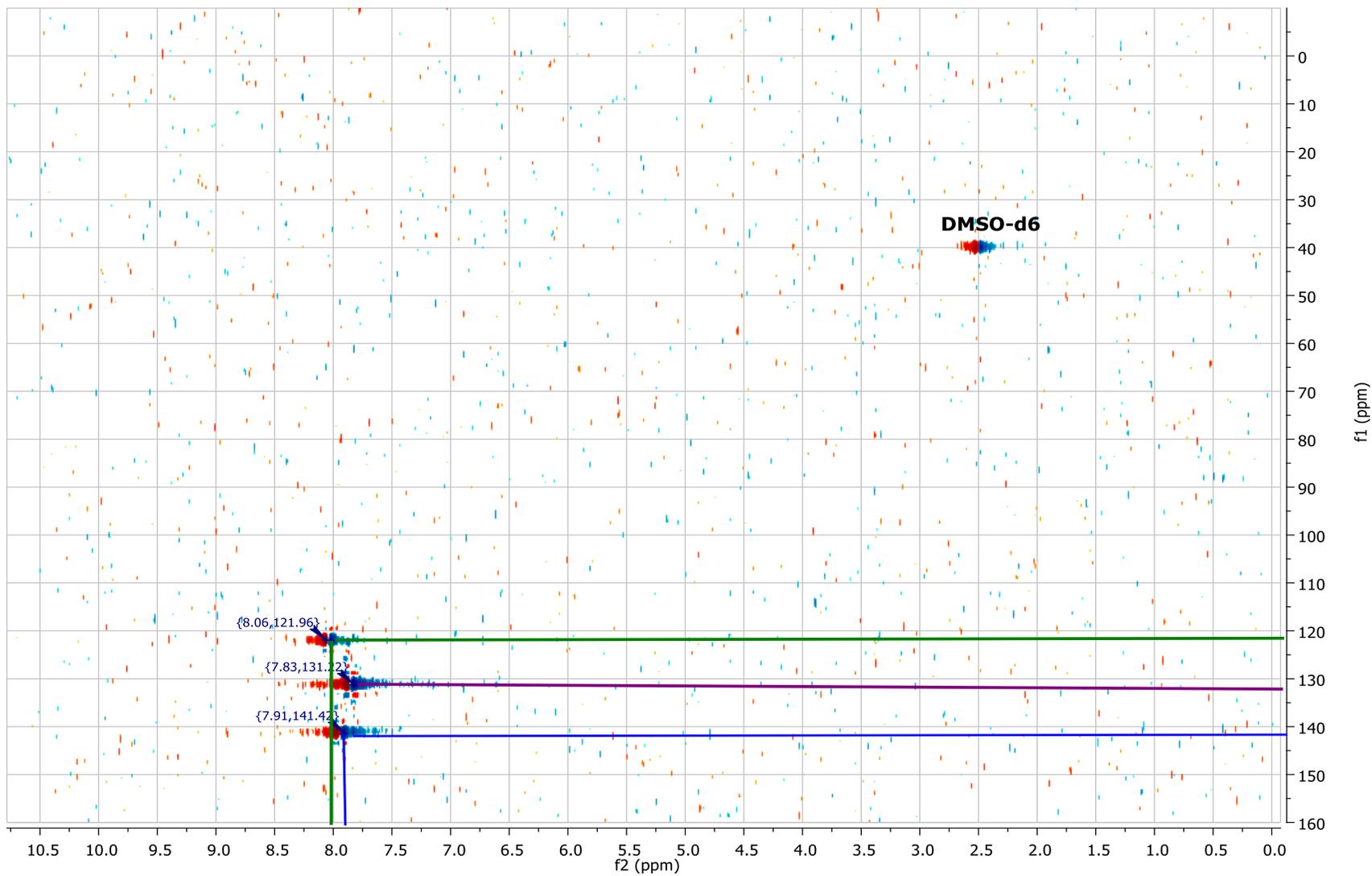
ANEXO 4. Espectro de RMN ^1H de la molécula AFCE-01.



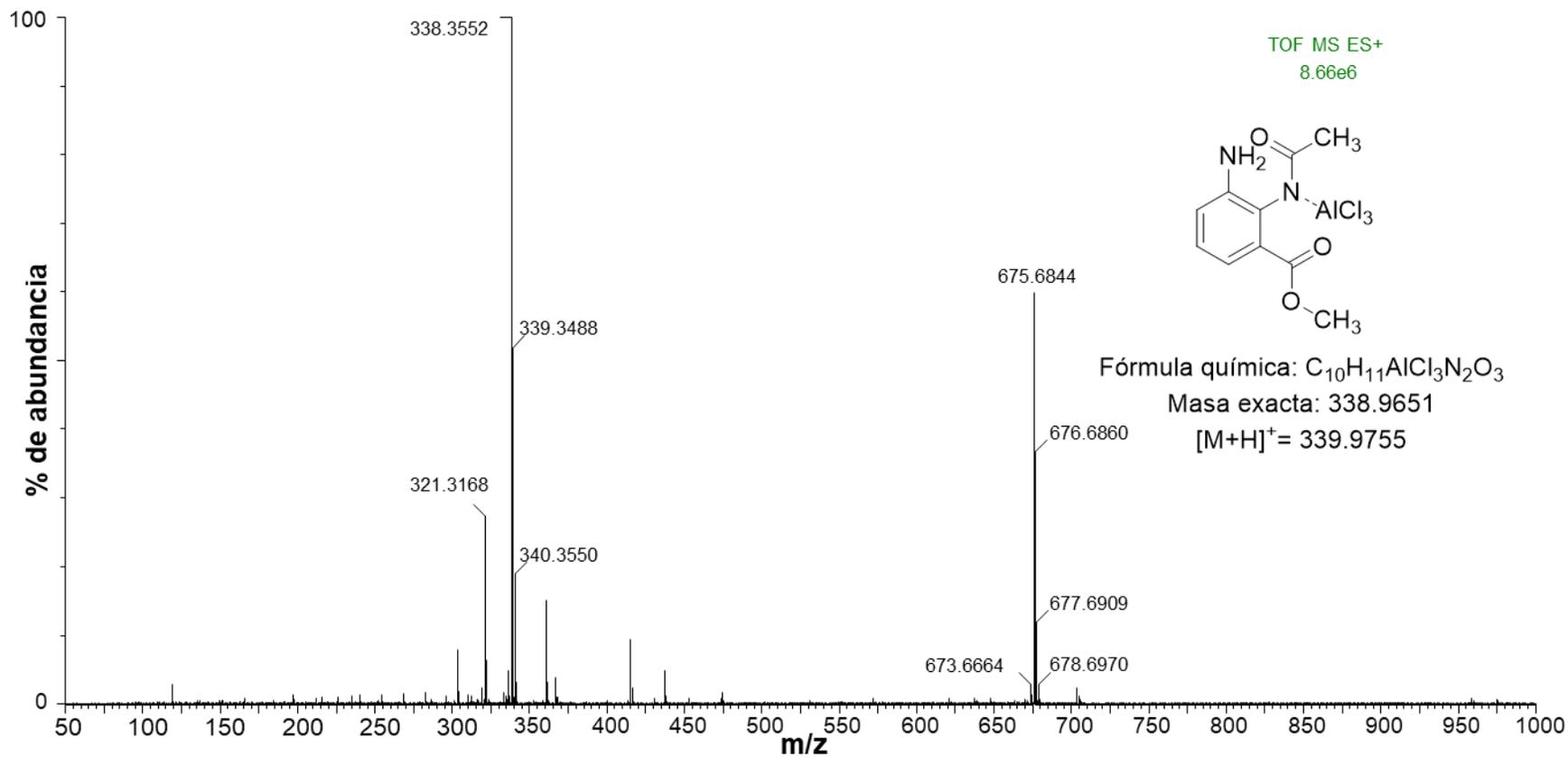
ANEXO 5. Espectro de RMN ^{13}C de la molécula AFCE-01.



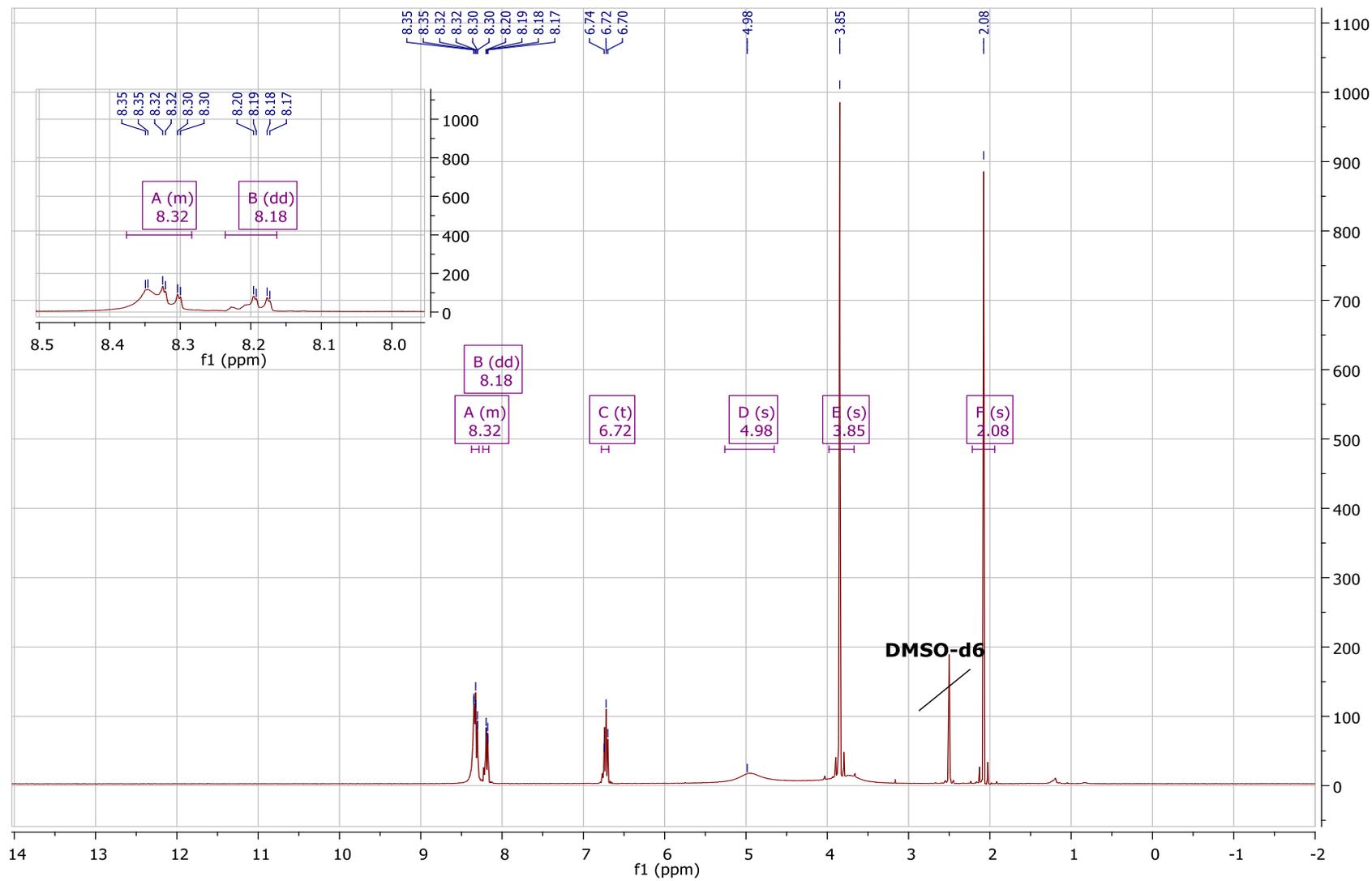
ANEXO 6. Espectro de RMN DEPT ¹³C de la molécula AFCE-01.



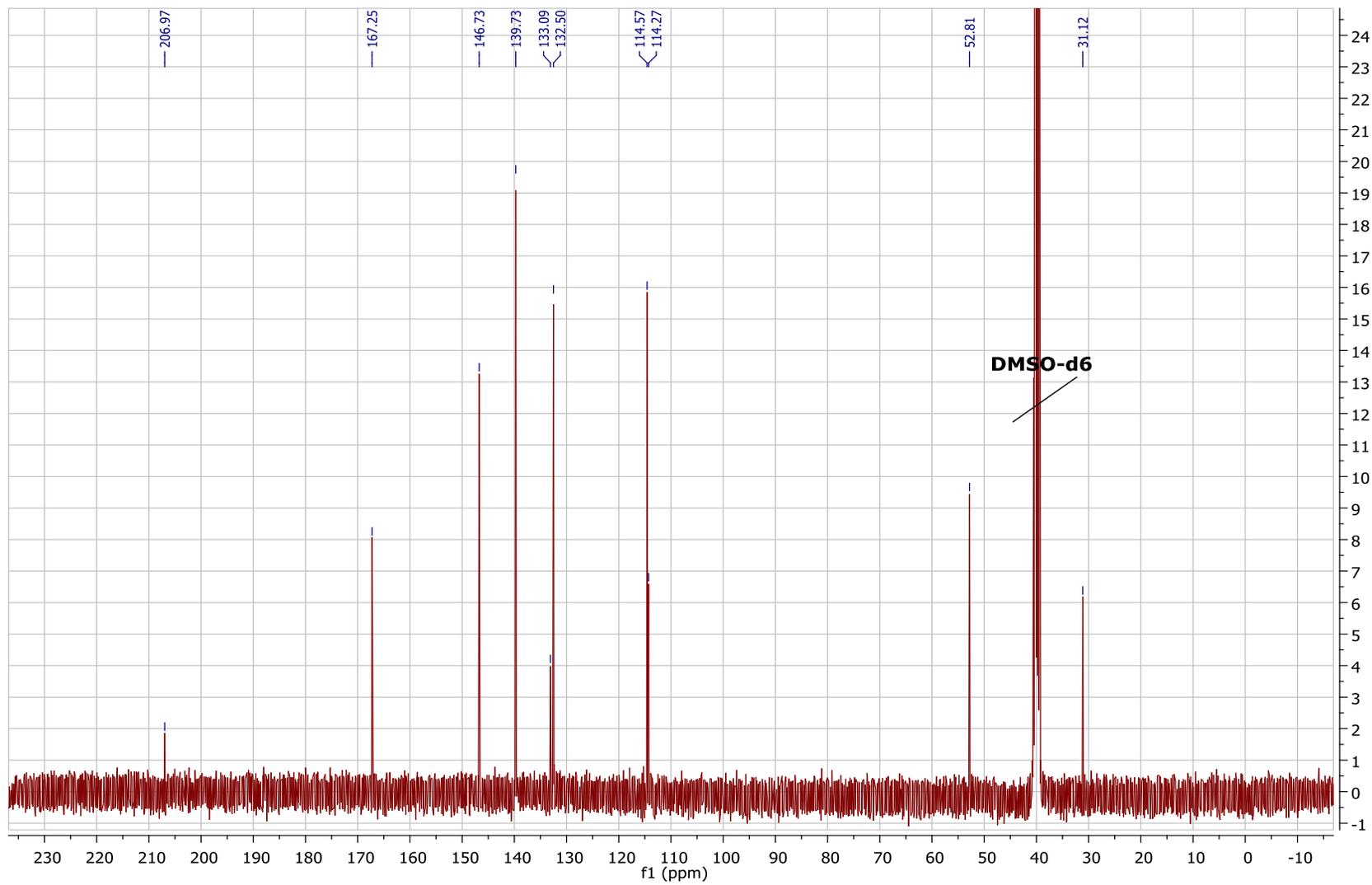
ANEXO 7. Espectro de RMN HSQC de la molécula AFCE-01.



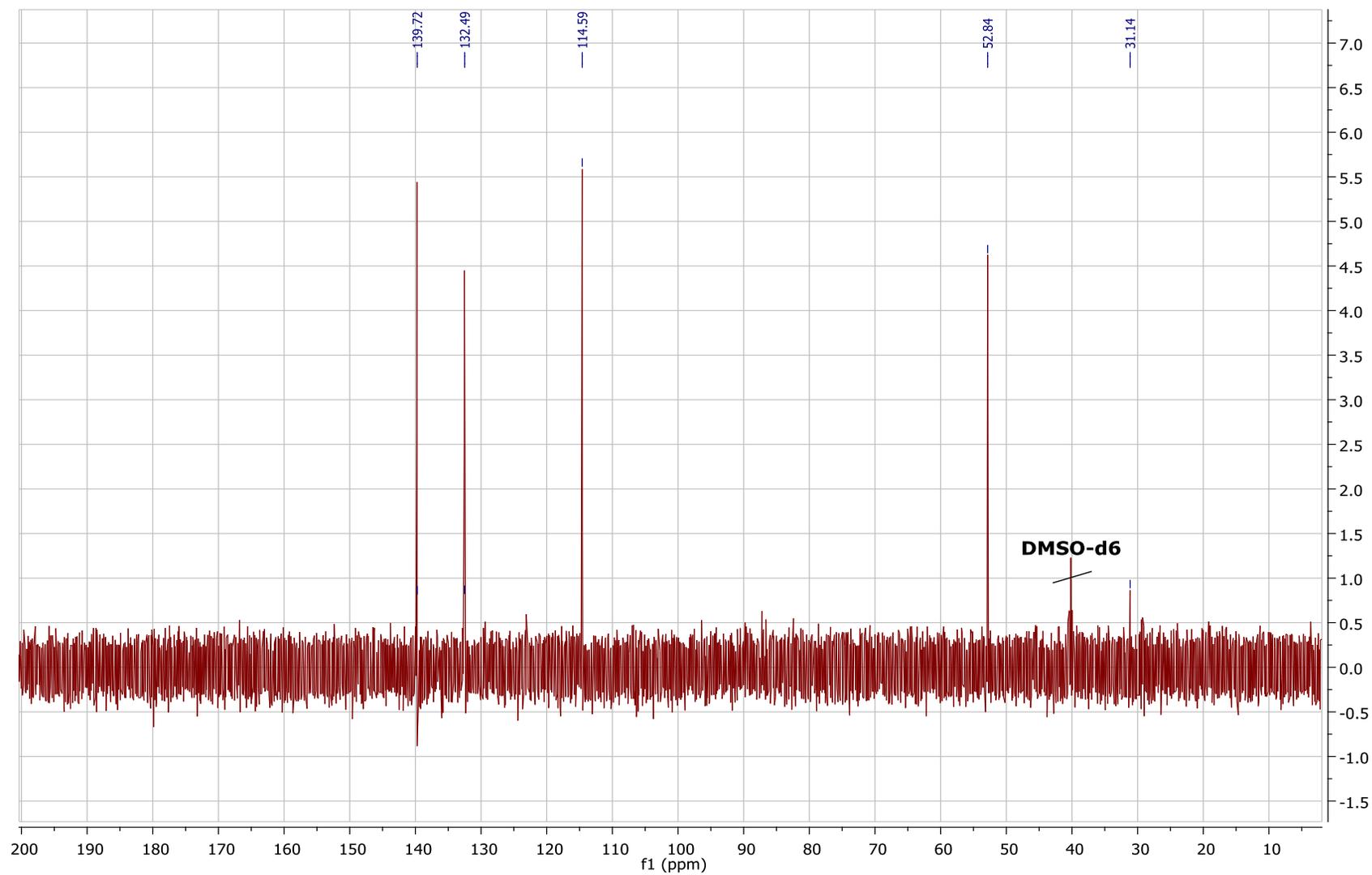
ANEXO 8. Espectro de masas de la molécula AFCE-03. Presenta un pico base de 338.3552 (100 % de abundancia), pico del ion molecular con un valor de 339.3488 $[M+H]^+$.



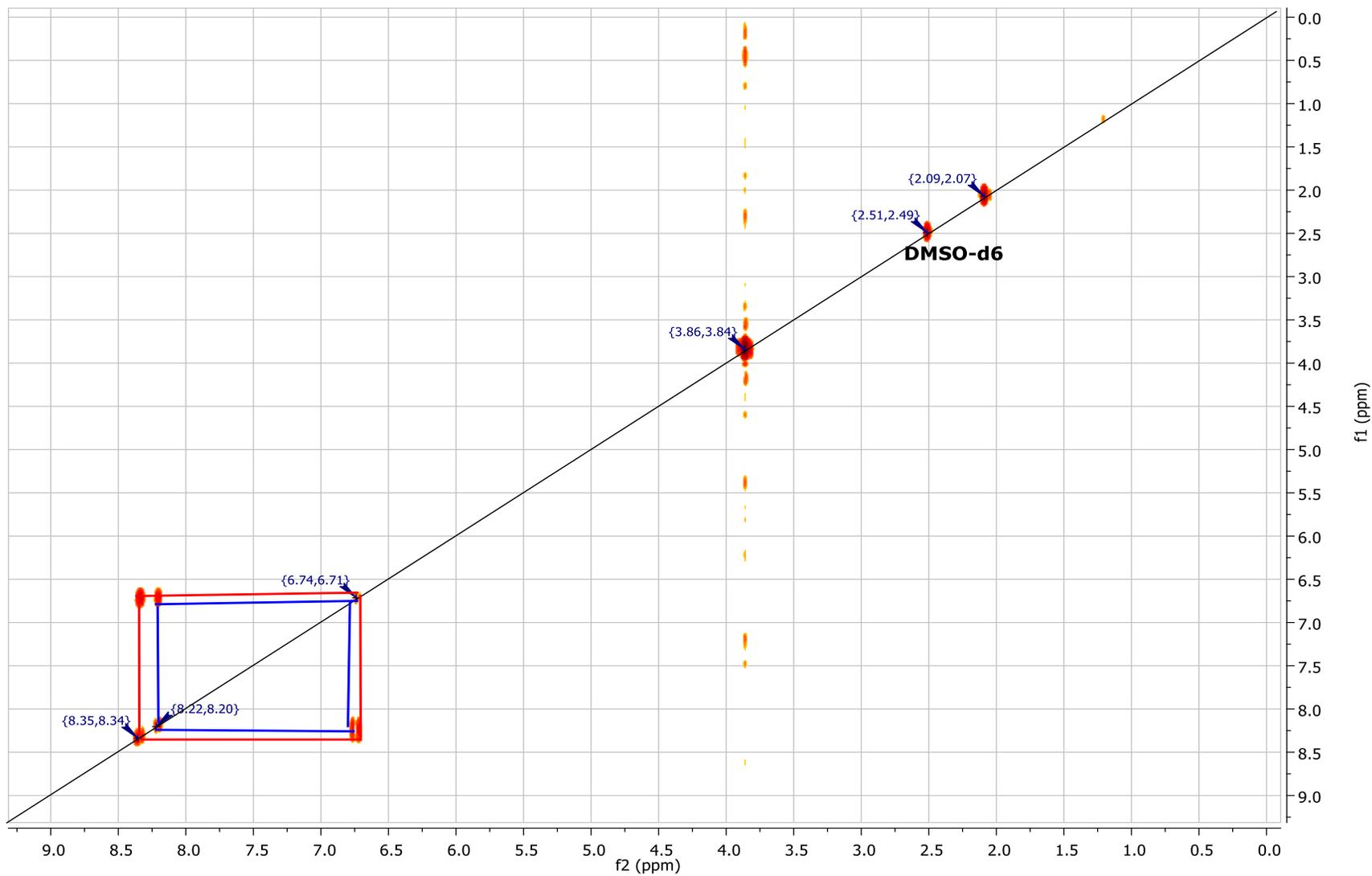
ANEXO 9. Espectro de RMN ^1H de la molécula AFCE-03.



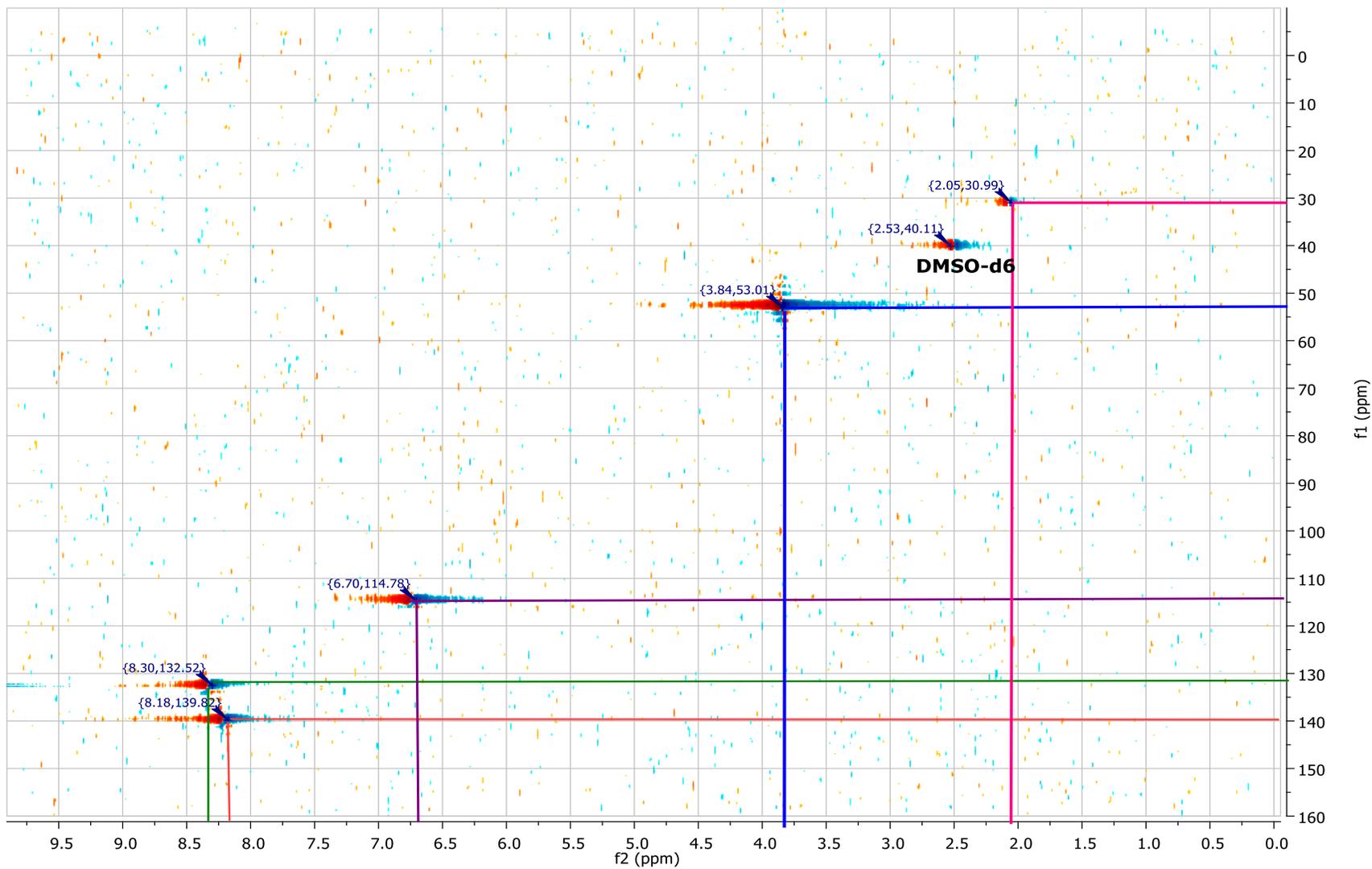
ANEXO 10. Espectro de RMN ¹³C de la molécula AFCE-03.



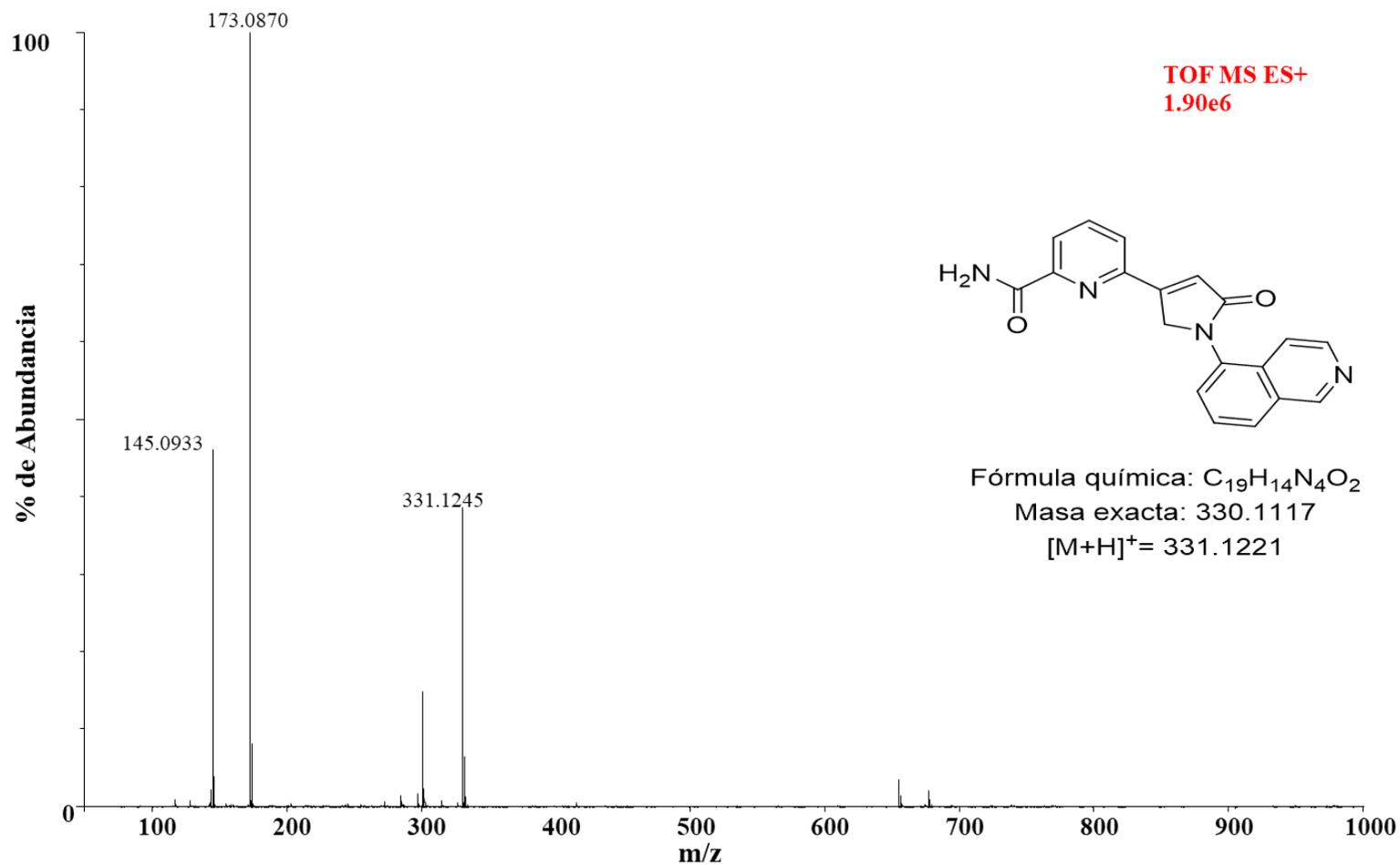
ANEXO 11. Espectro de RMN DEPT ^{13}C de la molécula AFCE-03.



ANEXO 12. Espectro de RMN COSY de la molécula AFCE-03.



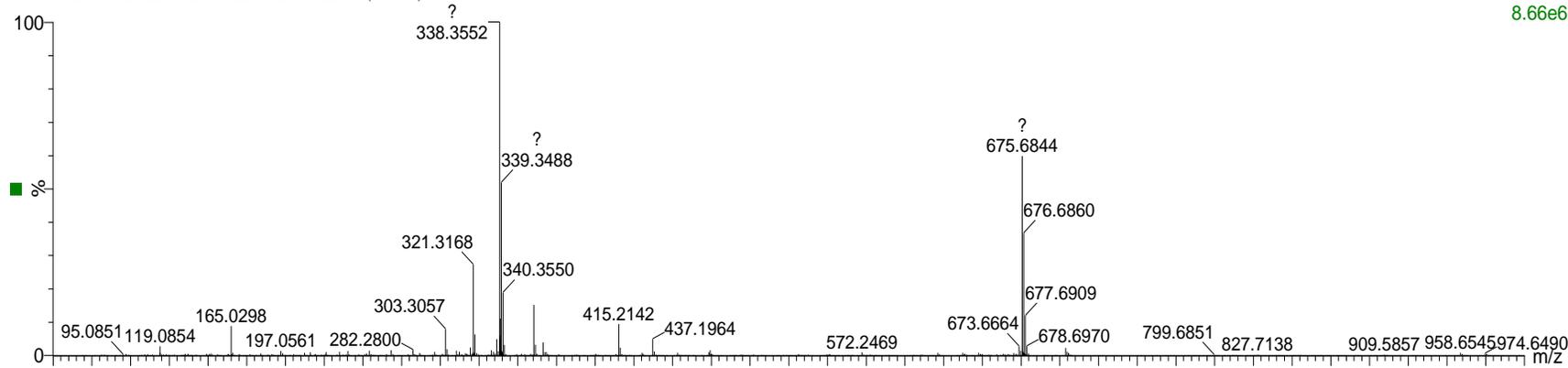
ANEXO 13. Espectro HSQC de la molécula AFCE-03.



ANEXO 14. Espectro de masas de la 6-(1-(isoquinolin-5-il)-2,5-dihidro-1H-pirrol-3-il)picolinamida. Se calculó la masa exacta con un valor de 330.1117 g/mol y se presenta el ion molecular con un valor de 331.1221 $[M+H]^+$ con porcentaje de abundancia del 40 %. Además se observa el pico base con valor de 173.0870.

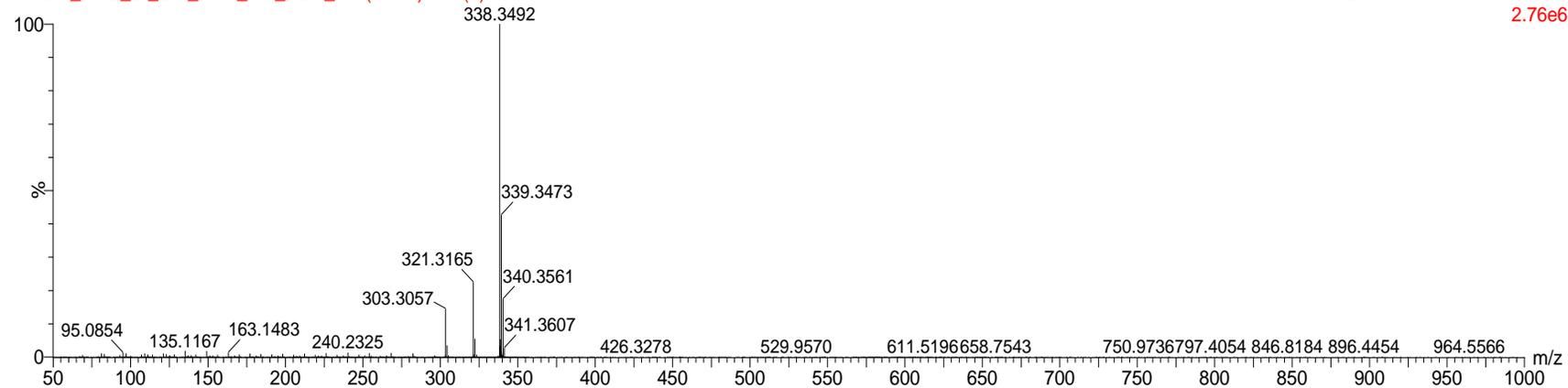
171211_AME_BI_ESI_POS_MS_DDA_3 1 (0.046)

1: TOF MS ES+
8.66e6



171211_AME_BI_ESI_POS_MS_DDA_3 1 (0.051) Cm (1)

2: TOF MSMS 338.32ES+
2.76e6



ANEXO 15. Espectro de masas de la molécula AFCE-03 (MS/MS). Parte superior espectro de masas y en la parte inferior se observa el espectro de MS/MS para un valor de 338.32.

ABREVIATURAS

AFCE-01	Código de la molécula (S)-6-(1-(isoquinil-5-il)-5-oxopirrolidin-3-il)picolinamida
AFCE-02	Código de la molécula (S)-6-(1-(bencimidazol-4-il)-5-oxopirrolidin-3-il)picolinamida
AFCE-03	Código de la molécula 3-(4-(6-carbamoilpiridin-2-il)-2-oxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-2-formamidobenzoato de metilo
AP	Anterior-posterior
ATP	Trifosfato de adenosina (por sus siglas en inglés)
BHE	Barrera hematoencefálica
BINAP	(1,1'-Binaftaleno-2,2'-di-il)bis(difenilfosfina)
BRI	Brivaracetam
CICUAL	Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio
CRETI	Corrosivo, reactivo, explosivo, tóxico, infeccioso
COSY	Espectroscopía de correlación (por sus siglas en inglés)
°C	Grados centígrados
DV	Dorso-ventral
ELT	Epilepsia del lóbulo temporal
EM	Espectrometría de Masas
ESI	Ionización por electrospray (por sus siglas en inglés)
FAE	Fármaco anticonvulsivo
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos (por sus siglas en inglés)
g	Gramos
GABA	Ácido γ -aminobutírico
h	Horas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HCOOH	Ácido formico
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (por sus siglas en inglés)
HSQC	
Hz	Hertz
i.c.v	Intracerebroventricular
i.p	Intraperitoneal
IFD	Acoplamiento Molecular de Ajuste Inducido (por sus siglas en inglés)
ILAE	Liga Internacional contra la Epilepsia (por sus siglas en inglés)
INP	Instituto Nacional de Pediatría
kg	Kilogramo
KOH	Hidróxido de potasio
L	Lateral
LEV	Levetiracetam
LiCl	Cloruro de litio
LINAN	Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencia y Nanotecnología
M	Molar

MeOH	Metanol
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mmol	Milimoles
μmol	Micromoles
μL	Microlitros
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NMDA	<i>N</i> -metil-D-aspartato
NOM	Norma Oficial Mexicana
OMS	Organización Mundial de la Salud
PB	Amortiguador de fosfatos
Pd/C	Catalizador de paladio soportado en carbono
PILO	Pilocarpina
Q-TOF	Cuadropolo sencillo con analizador de masas de tiempo de vuelo (por sus siglas en inglés)
RPBI	Residuos peligrosos biológico-infecciosos
SAGARPA	Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SEL	Seletracetam
SNC	Sistema nervioso central
SV2A	Proteína de vesículas sinápticas 2A (isoforma A)
UAQ	Universidad Autónoma de Querétaro
UCB	Union Chimique Belge (Unión Química Belga, por sus siglas en francés)
UEITMA	Unidad de Equipos para Investigación Translacional en Modelos Animales