



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTICONVULSIVANTE DE UNA PIRAZOLOTRIAZINA OBTENIDA POR SÍNTESIS**

**Juan Camilo Escobar Bueno**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia  
Bogotá, Colombia

2016

# **ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTICONVULSIVANTE DE UNA PIRAZOLOTRIAZINA OBTENIDA POR SÍNTESIS**

**Juan Camilo Escobar Bueno**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Ciencias Farmacéuticas**

Director:

**MARIO FRANCISCO GUERRERO PABÓN MD. Dr. Sc.**

Línea de Investigación:

**Farmacología Experimental del Sistema Nervioso**

Grupo de Investigación:

**FARMOL**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia  
Bogotá, Colombia

2016

*A mi familia, por su amor y apoyo.  
Y para todos aquellos para los cuales  
he significado algo en sus vidas.*

## **Agradecimientos**

Para comenzar me gustaría expresar mis agradecimientos a la Universidad Nacional de Colombia con sede en Bogotá por permitirme realizar la maestría con ustedes, el apoyo por parte de sus unidades administrativas y personal docente durante este proceso.

Al profesor Mario Francisco Guerrero Pabón, por aguantarme, asesorarme, acompañarme, ayudarme y sobretodo enseñarme durante cada uno de los aspectos importantes en el desarrollo de mi tesis y mi avance como persona e investigador. Gracias

Al Doctor Luis Enrique Cuca Suarez Director del Laboratorio de Productos Naturales Vegetales por facilitar las instalaciones y equipos necesarios para la síntesis y análisis del compuesto evaluado.

A todos los integrantes del laboratorio de productos naturales, por brindarme asesoría, amistad en el proceso de elaboración de la síntesis.

Al señor Martín Hermógenes Estrada por haber sembrado las bases para el desarrollo de esta investigación y por el asesoramiento brindado en sus comienzos.

A la Facultad de Ciencias y sobre todo al Programa de Farmacia por las clases, la compañía, las instalaciones y el acompañamiento.

Al Bioterio del Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias. Al Fondo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia (VRI/DIB, Código HERMES: 16036, 14798).

Y por último un especial agradecimiento a mi familia, porque sin su apoyo no habría escrito estas palabras.

## Resumen

Este trabajo se orientó a avanzar en el estudio de la actividad anticonvulsivante de 2-etiltio-7-metil-4-(4-metilfenil)pirazolo[1,5-a][1,3,5]triazina (MH4b), compuesto obtenido por síntesis que en estudios previos mostró actividad anticonvulsivante en la prueba de electroshock además de una acción inhibitoria selectiva sobre monoamino oxidasa B. Para esto, se examinó el efecto de MH4b en función de la dosis (50, 150 y 300 mg/kg, v.o.) en ratones ICR sometidos a convulsiones experimentales inducidas por descarga eléctrica de alta y de baja frecuencia (60 y 6 hz), o inducidas por los agentes proconvulsivantes: pentilentetrazol, picrotoxina y estriknina. De acuerdo con la prueba, se utilizaron los agentes de referencia: fenitoína sódica, levetiracetam, clonazepam, fenobarbital y diazepam. Adicionalmente se utilizó el vehículo solución salina normal (SSN) como tratamiento control. Los resultados mostraron efectos significativos de MH4b en las pruebas de convulsión eléctrica de alta y de baja frecuencia. Estos resultados sugieren que MH4b podría ser útil en el tratamiento de crisis tónicas clónicas generalizadas y crisis parciales refractarias.

**Palabras Clave**—Epilepsia, inhibidores de MAO, pirazolo-triazina, modelos experimentales, Crisis parciales.

## **Abstract**

*This work was directed to advance the study of the anticonvulsant activity of 2-ethylthio-7-methyl-4-(4-methylphenyl) pyrazolo [1,5-a] [1,3,5] triazine (MH4b), compound obtained by synthesis that previously showed selective inhibitory activity on monoamine oxidase B. The work examined the effect of MH4b (50, 150 and 300 mg / kg, p.o.) in ICR mice undergoing experimental convulsions induced by electric shock of high and low frequency (60 and 6 Hz), and the response induced by the proconvulsant agents: pentylenetetrazole, picrotoxin and strychnine. According to the test, the following reference agents were used: sodium phenytoin, levetiracetam, clonazepam, phenobarbital and diazepam. Normal saline vehicle (SSN) was the control treatment. The results showed that MH4b exerts protecting effects against maximal electroshock seizures (60 Hz) and seizures of low frequency (6 Hz). These results suggest that MH4b could be useful in the treatment of generalized tonic clonic seizures and refractory partial seizures.*

**Keywords:** *Epilepsy, MAO inhibitors, pyrazolo-triazine, experimental models, partial seizures.*

# Contenido

<b>Resumen</b>	<b>Pag. V</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>XII</b>
<b>Lista de tablas</b>	<b>XIII</b>
<b>Lista de símbolos y abreviaturas</b>	<b>XIV</b>
<b>Introducción</b>	<b>15</b>
<b>Planteamiento del problema</b>	<b>16</b>
<b>Justificación</b>	<b>17</b>
<b>Objetivos</b>	<b>18</b>
<b>1. Marco teórico</b>	<b>19</b>
1.1 Farmacología de la epilepsia	19
1.1.2 Fisiopatología de la epilepsia	20
1.1.3 Inicio y propagación de la crisis	20
1.1.4 tipos de crisis	21
1.2 Neurotransmisores y crisis epiléptica.	23
1.2.1 Receptores de GABA	24
1.2.2 Transportadores de GABA	24
1.3 Ensayos experimentales para la determinación de actividad anticonvulsivante	25
1.3.1 Convulsión inducida por Electroshock de alta frecuencia	25
1.3.2 Convulsión inducida por Pentilentetrazol (PTZ)	25
1.3.3 Convulsión inducida por Picrotoxina	25

1.3.4 Convulsión inducida por Estricnina	26
1.3.5 Convulsión inducida por Electroshock baja frecuencia	26
1.3.6 Convulsión inducida por Bicuculina	27
1.3.7 Convulsión inducida por Isoniazida	27
1.3.8 Convulsión inducida por Yohimbina	27
1.4 Neurotoxicidad. Ensayo del Eje Rodante	27
1.5 Aspectos químicos del anillo Pirazolo[1,5-a][1,3,5]triazino	28
1.5.1 Nomenclatura y estructura	28
1.5.2 Aspectos farmacológicos de las Pirazolotriazinas	28
<b>2 Metodología</b>	<b>30</b>
2.1 Síntesis	30
2.1.1 Descripción de la síntesis	30
2.2 Actividad anticonvulsivante	31
2.2.1 Convulsión inducida por electroshock de alta frecuencia	33
2.2.2 Convulsión inducida por pentilentetrazol	33
2.2.3 Convulsión inducida por picrotoxina y estricnina	34
2.2.4 Convulsión inducida por electroshock de baja frecuencia	34
2.3 Neurotoxicidad. Ensayo en eje rodante	34
2.5 Animales	35
2.6 Consideraciones éticas	35
2.7 Diseño experimental y análisis estadístico	35
<b>3 Resultados</b>	<b>37</b>
3.1 Síntesis	37
3.2 Ensayos experimentales de convulsión inducida	37
3.3 Neurotoxicidad. Ensayo en eje rodante	41



<b>4 Discusión de resultados</b>	<b>42</b>
<b>5 Conclusiones</b>	<b>44</b>
<b>6 Recomendaciones</b>	<b>45</b>
<b>7 Bibliografía</b>	<b>46</b>
<b>8 Anexos</b>	<b>48</b>
8.1 Anexo A: análisis de datos y espectros de los RMN <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C tomados al compuesto MH4	48
Anexo B: Producción científica	50

## Lista de figuras

	Pag.
<b>Figura 1:</b> Nomenclatura y numeración general de los sistemas pirazolo triazina.	28
<b>Figura 2:</b> Reacción general para la obtención del p-metilbenzil- iminoditiocarbamato.	31
<b>Figura 3:</b> Reacción general para la obtención del p-metilbenzil- iminoditiocarbamato de S-etilo	31
<b>Figura 4:</b> Reacción general para la obtención del p-metilbenzil- iminoditiocarbamato de S,S dietilo	32
<b>Figura 5:</b> Reacción final para la obtención del compuesto 2-etiltio-7-metil-4-(4- metilfenil) pirazolo[1,5-a][1,3,5]triazina	32
<b>Figura 6:</b> Prueba de descarga eléctrica 60Hz.	38
<b>Figura 7:</b> Prueba de convulsión inducida por Pentilentetrazol.	39
<b>Figura 8:</b> Prueba de convulsión inducida por Picrotoxina.	39
<b>Figura 9:</b> Prueba de convulsión inducida por Estricnina.	40
<b>Figura 10:</b> Prueba de Descarga eléctrica de 6 Hz.	40
<b>Figura 11:</b> Tiempos de permanencia. Eje rodante.	41
<b>Figura 12:</b> Asignación de numeración atómica al compuesto final MH4b para la interpretación de los espectros de RMN 1H y 13C.	48

## Lista de tablas

	Pag.
<b>Tabla 1:</b> Reactivos primera etapa síntesis del P-metilbencil-iminoditiocarbamato de S-etilo	30
<b>Tabla 2:</b> Segunda etapa, síntesis P-metilbencil.iminoditiocarbamato de S,S-dietilo	30
<b>Tabla 3:</b> Tercera etapa síntesis del 2-etiltio-7-metil-4-(4-metilfenil) pirazolo[1,5-a][1,3,5]triazina	30
<b>Tabla 4:</b> Protocolo general para la evaluación anticonvulsivante	35
<b>Tabla 5:</b> Actividad anticonvulsivante de la pirazolotriazina MH4b	37
<b>Anexo tabla 6:</b> Asignación de señales del espectro de RMN 1H tomado compuesto MH4b	48
<b>Anexo tabla 7:</b> Asignación de picos del espectro de RMN 13C tomado al compuesto MH4b	49

## Lista de abreviaturas

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
GABA	Acido gama aminobutírico
<i>GABA/BZD</i>	Receptor Gaba-benzodicepínico
<i>ESM</i>	Electroshock máximo
Hz	Hertz
Ip	Intraperitoneal
MAO-B	Monoaminoxidasa tipo B
<i>PET</i>	Tomografía por emisión de positrones
<i>PTZ</i>	Pentilentetrazol
<i>RMN 1H</i>	Resonancia magnética nuclear protónica
<i>RMN 13C</i>	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
<i>SNC</i>	Sistema nervioso central
<i>SSN</i>	Solución salina normal
<i>Vi</i>	Vía intraperitoneal
<i>Vo</i>	Vía oral
<i>Min</i>	minutos

## INTRODUCCIÓN

En la epilepsia, nunca, aún hoy en día, se ha logrado separar en este padecimiento lo orgánico de lo anímico y de ahí la enorme dificultad en su tratamiento. Quien sufre de esta enfermedad, sigue siendo un extraño en cualquier civilización; aún la más evolucionada de las comunidades padece de este sentimiento que ha desafiado todos los adelantos científicos y tecnológicos. Sin embargo, la educación personalizada del médico al paciente y su familia, ha logrado un gran avance en la estabilidad del mismo. Los nuevos medicamentos no han sido del todo lo que se esperaba, el 30% de las formas de epilepsia no responden a los tratamientos con medicaciones de primera y segunda generación<sup>1</sup>. El mayor impacto ha sido hecho por la cirugía en los casos intratables médicamente, los medios diagnósticos imagenológicos, el avance en el estudio eléctrico como la estereoencefalografía y los estudios de imágenes basados en metabolismo como el PET (tomografía por emisión de positrones), que han cambiado el panorama científico de la epilepsia dándonos mayor entendimiento de la enfermedad y por esto, unas mejores herramientas en la búsqueda de nuevos tratamientos.

Este trabajo está orientado a avanzar en el estudio de la actividad anticonvulsivante del análogo de pirazolo [1,5-a] [1,3,5] triazina: 2-etiltio-7-metil-4-(4-metilfenil) pirazolo[1,5-a][1,3,5]triazina (MH4b), que mostró efecto protector en el modelo de tamizaje de convulsiones experimentales inducidas por electroshock, en un estudio reciente sobre el perfil neurofarmacológico de compuestos de este tipo, realizado en el Departamento de Farmacia<sup>2</sup>.

En vista del interés despertado en particular por MH4b con respecto a varios análogos pirazolotriazínicos, se busca determinar su posible efectividad en otros modelos experimentales de convulsiones y ampliar el estudio a diferentes dosis de los ya realizados en el tamizaje farmacológico. Esto permitirá reunir más elementos de juicio con el fin de establecer si el compuesto tiene el potencial de constituirse en una nueva molécula con potencial farmacológico, para el tratamiento de los trastornos epilépticos y desórdenes asociados.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La epilepsia es una enfermedad crónica originada en la sustancia gris cerebral que afecta al 0,5 - 2% de la población, esta enfermedad es más común en niños y aún no existe un fármaco ideal para el tratamiento de la misma. Es un conjunto de trastornos neurológicos crónicos que tienen en común la existencia de episodios repentinos y transitorios de descargas anormales e hipersincrónicas de un lugar del SNC y que alcanza la corteza cerebral, con o sin pérdida de la conciencia. Estos fenómenos se conocen con el nombre de crisis o comicios y pueden ser de origen motor (convulsiones), sensitivo, autonómico o psíquico (ilusiones, alucinaciones) <sup>1</sup>.

Las personas que padecen esta enfermedad presentan dificultades en el desarrollo de su vida cotidiana ya que los episodios pueden aparecer en cualquier momento y sin advertencia. Estas personas se privan de hacer cosas tan normales como conducir un vehículo, montar bicicleta, nadar, practicar algún deporte o incluso salir solos a caminar<sup>1</sup>.

Con el propósito de mejorar la calidad de vida de las personas que padecen esta enfermedad, muchos grupos de investigación profundizan en el estudio de moléculas que presentan actividad anticonvulsivante, esperando encontrar nuevos fármacos que a futuro mejoren el tratamiento de esta enfermedad y por tanto la calidad de vida de los pacientes.

El compuesto pirazolotriazínico denominado MH4b presentó un perfil de tipo anticonvulsivante en el tamizado neurofarmacológico inicial con agentes análogos (Estrada, 2010) y, dado que los trastornos epilépticos engloban una variedad de enfermedades de fisiopatología, curso, pronóstico y manejo diferente, es necesario valorar el efecto de esta molécula en otros modelos de convulsión con miras a precisar su papel como fuente potencial de nuevos agentes antiepilépticos.

## JUSTIFICACIÓN

En estudios anteriores realizados por Estrada Valencia<sup>2,3</sup> se encontró que un derivado de las pirazolo[1,5-a][1,3,5]triazinas más específicamente la molécula nombrada MH4b, mostró actividad anticonvulsivante en el ensayo de convulsión inducida por electroshock. Este modelo es uno de los más utilizados durante la búsqueda de nuevos compuestos antiepilépticos; los compuestos que protegen contra las convulsiones en este ensayo eliminan la fase tónica de la convulsión, lo cual se observa por la ausencia de la extensión de las patas traseras del animal.

Por este motivo las moléculas que demuestren protección en este ensayo son consideradas como posibles anticonvulsivantes y antiepilépticas, y por tanto vale la pena profundizar en su estudio con el fin de determinar hasta qué punto pueden ser o no una posibilidad terapéutica.

No obstante, considerando que los trastornos epilépticos constituyen un síndrome que abarca diverso tipo de patologías con procesos fisiopatogénicos y manejo farmacológico diferente, era necesario evaluar el compuesto MH4b en otros modelos de convulsión experimental, tales como el de convulsión eléctrica de baja frecuencia (6 Hz), modelo de las crisis parciales refractarias; el de convulsión inducida por picrotoxina, modelo de las crisis asociadas a defectos de GABA-A y el de convulsión inducida por estriquina, modelo de las crisis asociadas a déficit de glicina, pruebas éstas que complementan la batería de ensayos iniciado previamente con la prueba de convulsión por electroshock, modelo de las crisis tónicas clónicas generalizadas y la prueba de convulsión por pentilentetrazol, modelo de las crisis de ausencia. Estos ensayos permitieron precisar y ahondar en el perfil anticonvulsivante de MH4b. Adicionalmente, se valoró la neurotoxicidad aguda del compuesto, utilizando la prueba del eje rodante.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Determinar el perfil anticonvulsivante del compuesto "MH4b": pirazolo [1,5-a] [1,3,5] triazina: 2-etiltio-7-metil-4-(4-metilfenil) pirazolo[1,5-a][1,3,5]triazina.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la efectividad anticonvulsivante de MH4b en el modelo de crisis de ausencia inducidas por pentilentetrazol.
- Determinar la efectividad anticonvulsivante de MH4b en el modelo de crisis tónicas clónicas generalizadas inducida por electroshock.
- Determinar la efectividad anticonvulsivante de MH4b en el modelo de crisis refractarias inducidas por descargas eléctricas de baja frecuencia.
- Determinar la efectividad anticonvulsivante de MH4b en el modelo de convulsión química inducido por picrotoxina.
- Determinar la efectividad anticonvulsivante de MH4b en el modelo de convulsión espinal inducido por estriquina.
- Determinar la neurotoxicidad de MH4b según la prueba del eje rodante.



## MARCO TEORICO

Esta sección estará enfocada a la descripción de los diferentes tipos de epilepsia conocidos, así como su tratamiento farmacológico e historia. Además contará con los aspectos químicos y farmacológicos del anillo Pirazolo[1,5-a][1,3,5]triazino.

### 1.1 FARMACOLOGIA DE LA EPILEPSIA.

La era de la farmacoterapia anticonvulsivante comenzó con la síntesis de fenobarbital en 1912 por Loewe, Juliusburger e Impens, trabajando independiente, pero simultáneamente<sup>5</sup>, comercializado por Bayer bajo el nombre de Luminal®. En general, el fenobarbital ha persistido como un fármaco eficaz, pero posee efectos adversos sobre las facultades cognitivas<sup>6</sup>. Aún sigue siendo una alternativa terapéutica por ser económico, efectivo y ampliamente conocido<sup>1</sup>. El segundo fármaco efectivo como anticonvulsivante fue fenitoína, introducido por H.H. Merrit y T.J. Puttman<sup>7</sup>. Estos dos principios activos han sido muy efectivos en el control de las crisis tónicas clónicas generalizadas pero inefectivos en las crisis de ausencia<sup>7</sup>. Así, Zimmerman y Burgemeister, en 1958<sup>8</sup>, sintetizaron la etosuximida, específica para esta forma de epilepsia.

Con esas tres medicaciones se logró controlar los tipos de crisis más frecuentemente vistas en clínica<sup>8</sup>. Las Benzodiazepinas fueron introducidas por Henri Gastaut en la década del 60. Un laboratorio suizo, quizá el más grande del mundo, hizo la investigación de carbamazepina, que apareció en 1963 pero solamente para el tratamiento de la neuralgia del trigémino. Posteriormente, hacia 1968, se autorizó su uso en epilepsia<sup>8</sup>. Es especialmente útil en las crisis focales y sigue siendo uno de los más utilizados en la terapéutica actual<sup>6</sup>. Posteriormente durante la búsqueda de medicamentos se encontró que el Diacepam, derivado de las benzodiazepinas era efectivo por su rápida acción en el tratamiento del estado epiléptico, sin embargo su efecto sedante lo hace poco práctico como tratamiento de mantenimiento.<sup>8</sup>

Durante aproximadamente 25 años el desarrollo de nuevos antiepilépticos se detuvo hasta alrededor del año 1985 donde inicio la era de los fármacos conocidos como "fármacos de diseño"<sup>9</sup>. Dentro de esta categoría podemos encontrar fármacos como la Vigabatrina, un análogo del GABA que se proyectó como inhibidor de la enzima GABA transaminasa que interviene en la degradación del GABA<sup>9</sup>. Lamotrigina, con efectos farmacológicos similares a la fenitoína y carbamazepina actuando sobre los canales de sodio, con inhibición de los aminoácidos excitadores<sup>9</sup>. Gabapentina inicialmente proyectado como un análogo del GABA, sorprendió por su mecanismo de acción carente de efectos sobre el GABA y actuando sobre los canales de calcio tipo T, mediante la inhibición de diversos neurotransmisores y moduladores que en detalle aún no están claros<sup>9</sup>.

Para el caso de Colombia hay aproximadamente veinte casos de epilepsia por cada mil habitantes<sup>10</sup>. Parece que en estudios recientes<sup>10</sup> ha bajado esta prevalencia, pero han reaparecido nuevos elementos de riesgo como: violencia, falta de higiene, desplazamientos forzados, etc., y es posible que nuevamente lleguemos a las primeras cifras. Esto quiere decir que en Colombia hay cerca de 800.000 personas con epilepsia<sup>10</sup>, y, si consideramos que cada persona tiene influencia sobre diez personas más que componen el núcleo familiar en nuestro país, concluimos que cerca de ocho millones de

colombianos padecen directa o indirectamente las consecuencias de esta enfermedad<sup>10</sup>.

El acontecimiento característico de la epilepsia es la crisis, que es consecuencia de descargas episódicas de impulsos de alta frecuencia a partir de un grupo de neuronas encefálicas<sup>1</sup>. Lo que comienza como una descarga anormal local puede propagarse a otras regiones del encéfalo. El lugar de la descarga primaria y la magnitud de la propagación determinan los signos que aparecen, los cuales pueden oscilar entre un breve lapso de inatención hasta un episodio convulsivo completo de varios minutos de duración asociado a sensaciones y conductas extrañas.

Los signos completos dependen de la región del encéfalo afectada, si la afectación es en la zona de la corteza motora los síntomas serían convulsiones, en la zona del hipotálamo se produce descarga autónoma periférica, y cuando se afecta la sustancia reticular de la parte superior del tronco cerebral hay una pérdida de conciencia.

### **1.1.2 Fisiopatología de la epilepsia**

La corteza cerebral incluye dos tipos de neuronas: las de proyección o neuronas principales, encargadas de enviar información a neuronas distantes (ejemplo: las neuronas piramidales), y las interneuronas las cuales participan en circuitos locales con influencia en la actividad de neuronas cercanas. La mayor parte de las neuronas principales constituye sinapsis excitadoras sobre las neuronas postsinápticas, y un número considerable de las interneuronas forman sinapsis inhibitorias sobre neuronas principales u otras neuronas inhibitorias<sup>11</sup>.

La inhibición recurrente puede ocurrir cuando una neurona principal hace sinapsis con una neurona inhibitoria, que a su vez hace sinapsis con neuronas principales para formar un circuito de retroalimentación negativa<sup>11</sup>.

El mecanismo básico de la excitabilidad neuronal es el potencial de acción. El estado hiperexcitable resulta del incremento de la neurotransmisión excitadora sináptica, del decremento de la neurotransmisión inhibitoria, de una alteración en los canales iónicos dependientes de voltaje o de alteraciones en la concentración de iones intracelulares o extracelulares que favorezcan la despolarización de la membrana. También puede ocurrir que varios estímulos excitadores sincrónicos, debajo del umbral de descarga, produzcan un estado hiperexcitable al sumarse en las neuronas postsinápticas<sup>11</sup>.

### **1.1.3 Inicio y propagación de la crisis**

Las descargas hipersincrónicas que ocurren durante una crisis, pueden iniciar en una región pequeña de la corteza y luego diseminarse hacia regiones vecinas. El inicio de la crisis se debe a los siguientes eventos concurrentes: a) brotes de potenciales de acción de alta frecuencia, y b) hipersincronización de una población neuronal. Los brotes sincronizados de un número suficiente de neuronas producen descargas de puntas o espigas en el electroencefalograma (EEG). A nivel celular, la actividad epileptiforme causa la despolarización sostenida de las neuronas, que resulta en brotes de potenciales de acción, una despolarización en meseta asociada a la terminación del brote de potencial de acción, así como una repolarización rápida seguida por hiperpolarización. Esta secuencia se conoce como cambio paroxístico de despolarización<sup>12</sup>.

La actividad de descarga, resultado de despolarización relativamente prolongada en la membrana neuronal, se debe al ingreso de calcio extracelular a la célula, lo que conduce a la abertura de los canales de sodio dependientes de voltaje, la entrada de sodio a la neurona y la generación de potenciales de acción repetitivos<sup>12</sup>. La subsecuente hiperpolarización, después del potencial, se realiza a través de los receptores GABA y por entrada de cloro a la neurona o la salida de potasio de la misma, según el tipo celular<sup>12</sup>.

La propagación de la crisis epiléptica es el proceso por el cual una crisis parcial se disemina en el cerebro, y ocurre cuando hay suficiente activación para reclutar neuronas circundantes. Esto genera pérdida de la inhibición en estas regiones y la diseminación de la actividad epiléptica a través de conexiones corticales locales o a más larga distancia, al utilizar vías de asociación como el cuerpo calloso<sup>13</sup>.

Puede evitarse la propagación de la actividad de descargas mediante la hiperpolarización generada por una zona de inhibición, creada por neuronas inhibitorias. Las descargas continuas conducen a: 1) un incremento en el potasio extracelular que impide la salida del potasio del interior de la célula, produciendo la despolarización de las neuronas cercanas; 2) acumulación de calcio en las terminales presinápticas que conduce a un incremento en la liberación de neurotransmisor, y 3) activación del receptor NMDA que induce despolarización y, al ocasionar más flujo de calcio al interior de la neurona, la mantiene activa<sup>13</sup>. El proceso por el cual las crisis se detienen (habitualmente después de segundos o minutos) tiene gran interés, pero se desconocen con exactitud; tampoco se sabe qué subyace en la falla de esta terminación espontánea de las crisis, que puede producir el status epilepticus (estado epiléptico) que puede poner en riesgo la vida de las personas.

#### 1.1.4 tipos de crisis

##### ➤ **Crisis parciales.**

Las crisis parciales son aquellas en que las descargas comienzan de forma local y así permanecen. Los síntomas dependen de las regiones afectadas y consisten en contracciones involuntarias, experiencias sensitivas, cambios de ánimo y comportamiento, o descargas autónomas anormales. Este tipo de epilepsia está relacionada a menudo con lesiones cerebrales locales y la incidencia de los episodios aumenta con la edad<sup>14</sup>. Se pueden subdividir las siguientes categorías:

- **Crisis Parciales Simples (CPS).** También denominadas “auras”, según la ILAE (Liga Internacional contra la Epilepsia), el aura es la parte de la crisis que acontece antes de la pérdida de conciencia y para la cual se mantiene el recuerdo'. Las auras o CPS pueden ocurrir de forma aislada o progresar hacia una crisis parcial compleja (CPC), con afectación de la conciencia, o hacia una crisis tónico-clónica. La duración de las auras o CPS suele ser variable, desde unos pocos segundos hasta unos minutos. Un detalle importante es que las crisis parciales simples no conllevan una pérdida de conciencia. Es decir, el paciente se da cuenta de lo que acontece al rededor, pero en ocasiones hay confusión, desorientación, o síntomas que impidan comunicarse con total normalidad<sup>15</sup>.

➤ **Crisis Parciales Complejas (CPC).** Al contrario que en las crisis parciales simples, en las CPC sí hay una pérdida de conciencia que frecuentemente se la suele denominar ausencia. La crisis parcial compleja se origina en un área concreta del cerebro, implica pérdida de conciencia, la duración suele ser variable (2- 5 minutos), y el paciente puede presentar automatismos de repetición como mover una mano, síntomas de masticación, etc. Después de la crisis suele haber un cuadro postictal, no es raro que el paciente no recuerde exactamente lo que estaba haciendo o muestre confusión y desorientación. El cuadro postictal suele ser breve y no reviste gravedad. La crisis parcial compleja puede derivar, o no, a una crisis tónico-clónica donde ya hay una afectación de todo el cerebro. Esto es lo que se denomina crisis parcial secundariamente generalizada. Porque la crisis se origina en un lugar y después afecta a todo el cerebro. Al contrario que en las crisis generalizadas primarias tónico-clónicas, donde hay una afectación de todo el cerebro desde el inicio de la crisis<sup>15</sup>.

➤ **Crisis Parcial Compleja secundariamente generalizada.** esta crisis comienza en un área determinada del cerebro (ya sea simple o compleja) y posteriormente afecta a todo el cerebro originando desencadenando una crisis tónico-clónica. Los síntomas son los mismos que en la crisis generalizada tónico-clónica, salvo por la única diferencia la cual consiste en el inicio de la crisis. En la crisis secundariamente generalizada, la crisis comienza en una zona determinada del cerebro y posteriormente hay afectación de todo el cerebro. En la crisis tónico-clónica primariamente generalizada se halla involucrado todo el cerebro desde el principio<sup>15</sup>.

➤ **Crisis generalizadas.**

Las crisis generalizadas son aquellas en las que la actividad eléctrica epileptiforme se manifiesta en todo el cerebro afectando a todo el encéfalo, incluido el sistema reticular, con una actividad eléctrica anormal de los dos hemisferios. Se caracteriza por la pérdida inmediata de la conciencia y se puede clasificar en dos grupos importantes.

➤ **Crisis de ausencia.** Antiguamente denominadas “Petit mal”. Surgen con más frecuencia que las tónico-clónicas, pueden ser varios episodios en un mismo día. Se caracterizan porque el paciente interrumpe bruscamente la actividad que está llevando a cabo, permaneciendo ausente durante varios segundos pero con escasas alteraciones motrices, recupera bruscamente la conciencia sin ningún efecto posterior. El patrón es distinto a la de la crisis parcial, en que una descarga asincrónica de alta frecuencia se propaga a partir del foco local<sup>16</sup>.

➤ **Crisis Atónicas.** Se caracterizan por la presencia de una pérdida brusca del tono muscular y de duración muy breve. Son características del Síndrome Lennox-Gastaut. Es un tipo de crisis que puede llegar a ser muy invalidantes, con frecuencia hay caídas, siendo típicas de epilepsias muy activas (muchas crisis)<sup>16</sup>.

➤ **Tónico - clónicas.** Antiguamente llamadas “grand mal”. Consisten en la contracción inicial de la totalidad de la musculatura, producen un espasmo rígido en extensión, puede haber un grito involuntario, la respiración se detiene y a menudo el afectado pierde el control de esfínteres. Esta fase tónica dura alrededor de un minuto, y, durante la misma, la cara sufre una contracción y se vuelve cianótica. Posteriormente aparece una serie de sacudidas violentas y sincrónicas que van disminuyendo su intensidad gradualmente durante dos a cuatro minutos<sup>16</sup>.

➤ **Estatus epiléptico.**

Se define como la crisis de repetición o crisis prolongada. Anteriormente el estatus epiléptico se determinaba cuando una crisis generalizada se prolonga por más de 10 minutos, recientemente la Academia Americana de Epilepsia sugiere que 'la duración de por lo menos 5 minutos de crisis continuas o, dos o más crisis, entre las cuales existe una recuperación incompleta de la conciencia'<sup>17</sup>.

Existen tantas formas de status como crisis hay reconocidas. El más frecuente es el status epiléptico tónico-clónico. Se da sobre todo en adultos y consiste en la repetición de crisis tónico-clónicas donde el paciente se halla en un estado postictal entre las crisis. Requiere atención médica inmediata y de no administrar el tratamiento adecuado puede terminar en la muerte del paciente<sup>17</sup>.

Las primeras denominaciones del estatus epiléptico se leen en las tablas de Sakikku datan del año 718 al 612 antes de Cristo: “Si el demonio lo posee muchas veces durante el transcurso de la noche, y en el momento de su posesión sus manos y pies están fríos, su aspecto es sombrío, su boca marrón y amarilla como los ojos se mantiene abriéndose cerrándose. Esto puede continuar por algún tiempo, pero el morirá”<sup>12</sup>.

## 1.2 Neurotransmisores y crisis epiléptica.

Para comprender en parte el funcionamiento del sistema nervioso, debemos comprender todos los componentes que lo constituyen. Uno de los aspectos fundamentales en el estudio de las neurociencias, es el dedicado a la neurotransmisión, mecanismo que permite que las células neurales se comuniquen entre sí. Es claro que este es un tópico muy extenso, pues se han descrito diversos tipos de neurotransmisores, inhibidores y excitadores<sup>18</sup>.

Los neurotransmisores cerebrales más importantes son el glutamato, el ácido-amino butírico (GABA), la acetilcolina (Ach), la noradrenalina, la dopamina, la serotonina y la histamina. El principal neurotransmisor excitador es el aminoácido glutamato. Los receptores inotrópicos son: ácido alfa-amino-2,3-dihidro-5-metil-3-oxo-4-isoxazolepropionico (AMPA), receptor de kainato y N-metil-D-aspartato (NMDA). Estos son permeables al sodio y al potasio y es precisamente la entrada de sodio y la salida de potasio a partir de la célula la que genera la despolarización de membrana y el potencial de acción; se diferencian por la variable permeabilidad a los cationes y la sensibilidad a los agonistas o antagonistas farmacológicos. El receptor NMDA tiene un canal para calcio, que está bloqueado por iones de magnesio en estado de reposo. El otro tipo de

receptores de glutamato es el metabotrópico<sup>18</sup>.

El descubrimiento de la inhibición sináptica directa comenzó con GABA, siendo el primer ejemplo claro de una sustancia neurotransmisora inhibitoria y el más importante. Fue identificado en el cerebro de mamíferos hace alrededor de 50 años<sup>18</sup>. La identificación de la vía de biosíntesis y metabolismo del ácido gamma-aminobutírico mostró que la producción, liberación, recaptación y metabolismo de esta sustancia ocurría en el sistema nervioso<sup>18</sup>. La dificultad para el entendimiento de la organización y el funcionamiento del sistema gabaérgico se debe a la gran diversidad tanto anatómica como fisiológica que tienen las distintas neuronas<sup>18</sup>.

### **1.2.1 Receptores de GABA**

La mayoría de los efectos inhibitorios rápidos de GABA son mediados por el receptor ionotrópico de GABA-A, un canal iónico activado por ligando. El receptor GABA-A es una proteína pentamérica transmembranal, cuyas subunidades forman el canal iónico. Un gran número de fármacos psicoactivos ejercen sus efectos principalmente o exclusivamente por medio de los receptores de GABA-A incluyendo: ansiolíticos, anestésicos, tranquilizantes y anticonvulsivantes<sup>14</sup>.

Estos receptores GABA-A, hacen parte de la superfamilia de receptores activados por ligando que incluyen los receptores nicotínicos de acetilcolina, receptores de glicina y los receptores de serotonina. La mutación de los receptores GABA-A está implicada en la génesis de la epilepsia idiopática generalizada, implicando la alteración de los mecanismos de activación del receptor, la expresión, y/o el tráfico de los receptores sobre la superficie celular<sup>14</sup>.

### **1.2.2 Transportadores de GABA.**

La transmisión sináptica gabaérgica finaliza cuando el GABA es removido de la hendidura sináptica en cuestión de milisegundos después de ser liberado. Aunque la difusión no puede ser olvidada, la mayoría de las moléculas del neurotransmisor se reciclan rápidamente por un sistema de recaptación celular de alta afinidad al sodio y proteínas transportadoras dependientes de cloro, localizadas en la membrana plasmática de las células gliales y en las terminales nerviosas presinápticas<sup>20</sup>.

Actualmente se han identificado cuatro transportadores para GABA. Unos están unidos a los transportadores de taurina y creatina y constituyen una subfamilia de transportadores para neurotransmisor de sodio/cloro. Una disfunción en el sistema de transporte de GABA también está implicada en la patología de diversos desordenes neurológicos<sup>20</sup>.

Las convulsiones se asocian con descargas eléctricas que pueden ser localizadas o masivas, afectando una o más regiones del cerebro. Los mecanismos son pocos entendidos. A nivel celular estos mecanismos se caracterizan por hiperexcitabilidad de poblaciones neuronales, por eso se ha hipotetizado que un déficit en la transmisión sináptica inhibitoria en el cerebro puede contribuir a la generación y a la expansión de las convulsiones<sup>20</sup>. Como ya se ha mencionado anteriormente, el mayor neurotransmisor inhibitorio en el cerebro es el GABA y le sigue la glicina. Los fármacos antiepilépticos pueden aumentar los niveles de GABA en el sistema nervioso central. La modulación de los receptores de GABA-A principalmente, sigue siendo una diana farmacológica para el desarrollo de nuevos fármacos antiepilépticos<sup>21</sup>.

El tipo de fármacos destinados al tratamiento de la epilepsia depende del tipo de

epilepsia a tratar, así, en la crisis de ausencia los fármacos están principalmente orientados al bloqueo de los canales de calcio, mientras que para los demás tipos de epilepsia se utilizan bloqueadores de los canales de sodio o potenciando la inhibición mediada por el ácido gamma-aminobutírico (GABA)<sup>21</sup>. Con un tratamiento farmacológico óptimo, la epilepsia se controla por completo en el 75% de los casos<sup>10</sup>.

### **1.3 Ensayos experimentales para la determinación de actividad anticonvulsivante**

#### **1.3.1 Convulsión inducida por Electroshock de alta frecuencia**

El electroshock es quizá uno de los modelos más antiguos que existe para desencadenar crisis epilépticas<sup>17</sup>. En este modelo las convulsiones son inducidas por la aplicación de una descarga eléctrica suficiente para llegar al cerebro, producir la convulsión y extenderse a través del sistema nervioso central. Las convulsiones producidas por electroshock son consideradas como convulsiones tónico y/o clónicas generalizadas. Se caracterizan por presentar una flexión tónica, seguida de una extensión tónica prolongada de las patas traseras del animal, finalmente se sucede una convulsión de tipo clónico<sup>17</sup>. Cuatro de los fármacos con mayor efectividad en el tratamiento de convulsiones parciales y tónico/clónicas generalizadas en humanos son fenitoína, carbamazepina, ácido valproico y fenobarbital son capaces de inhibir las convulsiones inducidas por electroshock en ratones. Esto demuestra que el modelo presenta una buena correlación en este aspecto<sup>22</sup>.

Algunas de las ventajas del ESM son su sencillez, rapidez y economía. Sin embargo, es conveniente estandarizar los parámetros del estímulo (voltaje, frecuencia, tiempo) de acuerdo con las condiciones del animal que va a ser empleado, ya que no todos responden de la misma manera.

#### **1.3.2 Convulsión inducida por Pentilentetrazol (PTZ)**

EL PTZ, un antagonista del GABA, es uno de los agentes farmacológicos más comúnmente utilizados para inducir convulsiones<sup>22</sup>. El PTZ se administra a los ratones por vía subcutánea en una dosis de 85 mg/Kg para producir convulsiones de tipo clónico. Las convulsiones clónicas en el ratón son definidas como episodios de espasmos musculares repetitivos que duran por lo menos 5 segundos<sup>21</sup>.

Los fármacos anticonvulsivantes que inhiben las convulsiones clónicas en este modelo son los mismos que se utilizan en el control de las crisis de ausencia y convulsiones mioclónicas en humanos. Por esta razón la inducción de convulsiones con pentilentetrazol es considerado como un modelo de crisis de ausencia y convulsiones mioclónicas.

#### **1.3.3 Convulsión inducida por Picrotoxina**

La picrotoxina es considerada como un antagonista de GABA-A modificando la función de canal de ion cloruro. Se inyectan 3.5 mg/Kg s.c de picrotoxina 30 minutos después de la administración ip (ó 60 m. si es oral) de la sustancia a evaluar. Se usa diazepam 10 mg/Kg como fármaco de referencia. Se registran los siguientes signos en un período de

30 minutos: convulsiones tónicas, convulsiones clónicas y muerte, así como el tiempo umbral, es decir el momento de aparición de la primera convulsión<sup>23</sup>.

#### **1.3.4 Convulsión inducida por Estricnina**

La glicina es un neurotransmisor inhibitorio de las motoneuronas y de las interneuronas de la médula espinal. La acción proconvulsivante de la estricnina es debida a la interferencia de la inhibición postsináptica mediada por glicina. Usualmente se usa nitrato de estricnina en dosis de 2 mg/Kg y como patrón diazepam 5 mg/Kg. El tiempo de corte es de 1 hora y se deben observar convulsiones en el 80% de los animales control<sup>23</sup>.

Se han introducido modificaciones al método: McAllister, en 1992 indujo convulsiones espinales en ratones por rotación a lo largo del eje corporal en el sentido de las manecillas del reloj y en sentido contrario por pretratamiento con dosis subconvulsivas de estricnina. Lambert y colaboradores (1994) evaluaron el antagonismo de derivados de glicina contra convulsiones inducidas con ácido mercapto propiónico (3-MPA).

#### **1.3.5 Convulsión inducida por Electroshock baja frecuencia.**

En el ensayo de convulsión inducida por electroshock de baja frecuencia (6 Hz) y de larga duración (3s), existen pocas referencias a nivel mundial; esto es debido a que los autores intentaban validarlo como un modelo de selección para ataques humanos parciales; aunque, los estudios farmacológicos conducidos no eran totalmente compatibles con la práctica clínica, lo que condujo a los autores a sugerir que el ensayo de 6 Hz no presentaba la misma utilidad clínica que otros modelos disponibles entonces (Brown., 1953). Pero al considerar la resistencia relativa de algunos pacientes a fenitoína y carbamazepina en el ajuste clínico, la carencia de sensibilidad del modelo de electroshock máximo y pruebas subcutáneas con PTZ al fármaco levetiracetam, la utilidad de ataques de 6 Hz como un ensayo potencial para la epilepsia resistente a la terapia fue reconsiderada y el modelo fue descrito de nuevo como el único modelo de ataque parcial agudo eléctricamente inducido en el cual levetiracetam fue eficaz<sup>4</sup>.

En la actualidad, el ensayo de 6 Hz es utilizado como una segunda opción para examinar aquellos compuestos que son encontrados inactivo en modelos como electroshock máximo y convulsión inducida por PTZ. Por consiguiente, el modelo de 6 Hz es de interés como un modelo que puede simular convulsiones referidas a aquellas epilepsias que presentan mecanismos celulares desconocidos y que por ende necesitan otras vías de tratamiento<sup>4</sup>.

La principal diferencia de este modelo con relación a la convulsión inducida por electroshock de alta frecuencia es que, en lugar de presentarse la extensión tónica de la prueba de electroshock de alta frecuencia, la convulsión inducida por el ensayo de 6 Hz, se caracteriza por la inmovilidad, una reacción de aturdimiento, movimientos clónicos de las patas delanteras y automatismo; similar al comportamiento que produce la epilepsia límbica en humanos.

El fármaco utilizado como patrón en este modelo es el levetiracetam el cual es el único que presenta un buen margen de protección frente a este modelo<sup>4</sup>.



### **1.3.6 Convulsión inducida por Bicuculina**

Este compuesto bloquea la acción del GABA por antagonismo competitivo en sus receptores postsinápticos. En el animal íntegro la bicuculina induce convulsiones mioclónicas. Una dosis iv de 0.55 mg/Kg induce convulsiones en el 90% de los animales con una mortalidad inferior al 10%. Los compuestos GABAérgicos tales como las benzodiazepinas en dosis relativamente bajas evitan la aparición de convulsiones mioclónicas por efecto de la bicuculina<sup>23,24</sup>.

### **1.3.7 Convulsión inducida por Isoniazida**

La isoniazida puede precipitar las crisis en pacientes con desórdenes convulsivos. El compuesto es considerado como un inhibidor de la síntesis de GABA y las convulsiones clónicas pueden ser controladas por efecto de fármacos ansiolíticos. Se utilizan 10 ratones machos o hembras los cuales son tratados bien sea con la sustancia en evaluación o con un fármaco de referencia (por ejemplo, diazepam 10 mg/Kg). La vía de administración puede ser oral o intraperitoneal. Los controles únicamente reciben vehículo. Se registra durante 120 minutos la ocurrencia de convulsiones clónicas o la muerte.<sup>24</sup>

### **1.3.8 Convulsión inducida por Yohimbina**

El antagonismo frente a convulsiones producidas por yohimbina en ratones se considera como modelo predictivo de efecto ansiolítico y de agentes GABA miméticos. Se utilizan ratones Swiss machos, los cuales son ubicados en cilindros plásticos translúcidos. Los fármacos en evaluación se administran por vía ip. 30 minutos antes de la inyección subcutánea de cloruro de yohimbina en dosis de 45 mg/Kg. La presencia de convulsiones clónicas se determina por un período de una hora<sup>24</sup>.

### **1.4 Neurotoxicidad. Ensayo del Eje Rodante**

Este modelo permite determinar si la administración de los compuestos de interés afecta el desempeño motor de los animales debido a un posible efecto depresor en el sistema nervioso central; se basa en la idea de que un animal con la función motora normal será capaz de mantener el equilibrio sobre el eje, siempre y cuando se mantenga normal su tono muscular.<sup>25</sup>

## 1.5 Aspectos químicos del anillo pirazolo[1,5-a][1,3,5]triazino.

### 1.5.1 Nomenclatura y estructura.

El sistema pirazolo[1,5-a][1,3,5]triazino es un heterociclo de cinco miembros el cual se encuentra unido por las posiciones 1 y 5 a la cara (la cual en la nomenclatura química es determinada) "a" de la 1,3,5-triazina, este heterociclo está formado por seis miembros con tres átomos de nitrógeno en posiciones 1,3 y 5.

Su estructura general se muestra en la figura 1: Nomenclatura y numeración general de los sistemas pirazolo triazina.

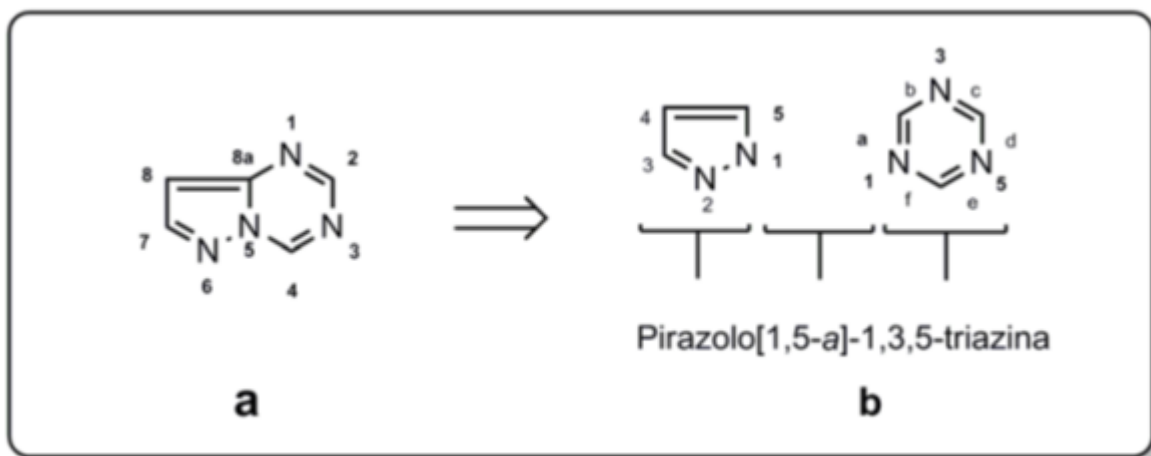


figura 1: "a" sistema general. "b" numeración utilizada en nomenclatura

La nomenclatura del anillo Pirazolo[1,5-a][1,3,5]triazino parte numerando el nitrógeno adyacente a la unión con el pirazol y de ahí hacia el siguiente nitrógeno del mismo sistema triazino como es mostrado en la figura anterior.

### 1.5.2 Aspectos farmacológicos de las Pirazolotriazinas

En general, entre los compuestos heterocíclicos fusionados, la pirazolo [1,5-a]triazina y sus derivados se les conoce que poseen actividad farmacológica sobre el sistema nervioso, es decir, propiedades ansiolíticas, anticonvulsivantes y analgesicas<sup>26</sup>. Además, algunos farmacóforos que contiene el esqueleto pirazolo<sup>27</sup>, exhiben múltiples aplicaciones farmacéuticas, tales como propiedades antifúngicas<sup>26</sup> o como potenciales agentes antimetabólicos [5 -10], como antagonistas de aminoácidos incluso potentes<sup>28</sup> o muestran actividades antiinflamatorias, antiasmáticas, antialérgicas e inmunosupresoras<sup>28</sup>. Existen varios métodos para la síntesis de fusión pirazolo [1,5-a] triazinas, a partir de varias aminopirazoles [10], aunque se ha informado que la 3-amino-1H-pirazoles reacciona con electrófilos bidentado para la síntesis de la pirazolo [1,5-a] triazinas<sup>29</sup>. Los derivados de Pirazolo [1,5-a] [1,3,5] triazinas han atraído un considerable interés de la comunidad química médica debido a su amplia gama de actividades biológicas<sup>30</sup>.

En 1976 Rooney y colaboradores patentaron varios compuestos conteniendo el sistema pirazolo[1,5-a][1,3,5]triazínico, entre ellos se encuentra la 4-amino-8-(4-piridil)pirazolo[1,5-a][1,3,5]triazina, al cual se le atribuye propiedades inhibitorias de la constricción bronquial inducida por histamina<sup>3,31</sup>.

Keitaro Senga y su grupo de colaboradores, evaluaron en 1982, la actividad inhibidora de varios compuestos sobre la fosfodiesterasa de AMP cíclico (AMPC), aislada de pulmón y corazón de conejo y cerebro de vaca. Uno de los hallazgos más importantes de este grupo fue que el sistema pirazolotriazínico presenta un mayor efecto como inhibidor de la fosfodiesterasa que el sistema pirazolopirimidínico. Los efectos de cada compuesto se compararon con los de teofilina, un dilatador bronquial que relaja la musculatura lisa inhibiendo precisamente la fosfodiesterasa de AMPC<sup>3,31</sup>.

En 1986 fue patentado por Kim y colaboradores, un grupo de pirazolotriazinas útiles en la prevención de úlceras gástricas o duodenales mediante la inhibición de las secreciones ácidas, según reportan los autores<sup>3,31</sup>.

La pirazolo[1,5-a][1,3,5]triazina fue patentada en 1995 por Jones y Colaboradores. Varios compuestos semejantes; además de varias triazolo[1,5-a][1,3,5]triazinas, se evaluaron como antagonistas de la adenosina, especialmente sus propiedades vasodilatadoras. Dichas propiedades se midieron en pruebas de afinidad por el receptor de adenosina, A<sub>2</sub><sup>26</sup>.

En 2007, el sistema pirazolo[1,5-a][1,3,5]triazínico fue evaluado como posible bioisómero de la adenina y a la vez como inhibidor de la fosfodiesterasa tipo 4 por Raboisson y colaboradores. Mediante cálculos computacionales y ensayos in vitro, se comprobó que existe una equivalencia entre purinas y algunas pirazolo[1,5-a][1,3,5]triazinas que permite el uso de las últimas como inhibidores de la fosfodiesterasa, lo que las implicaría en el posible tratamiento de enfermedades del SNC<sup>3,31</sup>.

En 2010, Martín Estrada, realizó un tamizaje farmacológico con análogos de sistema pirazolo[1,5-a][1,3,5]triazinas, en los cuales el compuesto llamado MH4b mostro actividad anticonvulsivante en el ensayo de electroshock de alta frecuencia, lo cual apunta a la utilización de este derivado como posible anticonvulsivante. Durante este mismo trabajo se encontró que los compuestos sintetizados presentan resultados positivos significativos frente a inhibición de MAO-B; por lo tanto pueden considerarse como compuestos interesantes para el desarrollo de nuevos fármacos con actividad ansiolítica, antipákinson y anticonvulsivantes<sup>3,31</sup>.

## METODOLOGÍA

### 2.1 Síntesis.

#### Reactivos.

**Tabla 1: reactivos primera etapa síntesis del P-metilbencil-iminoditiocarbamato de S-etilo**

Cloruro de p-metilbenzoilo
Tiocianato de potasio
Acetonitrilo
Acetato de Etilo
Etanotiol
Sulfato de sodio anhidro
Hexano

**Tabla 2: Segunda etapa, síntesis P-metilbencil-iminoditiocarbamato de S,S-dietilo**

Hidruro de sodio dispersión en aceite mineral.
Bromuro de etilo
Silica gel
DMF

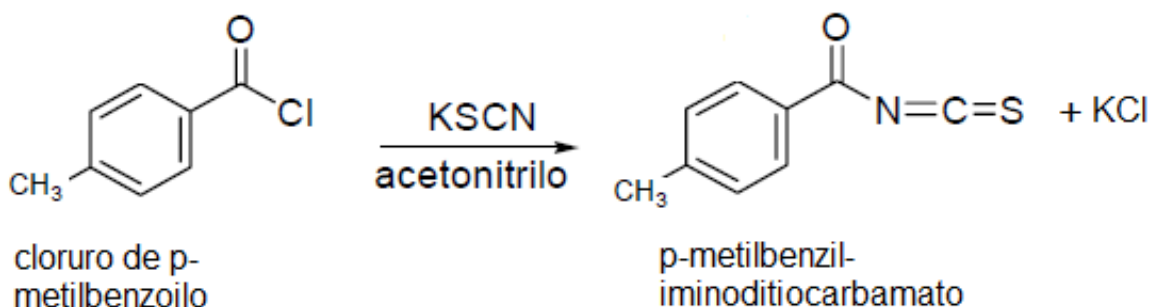
**Tabla 3: Tercera etapa síntesis del 2-etiltio-7-metil-4-(4-metilfenil) pirazolo[1,5-a][1,3,5]triazina.**

5-amino-3-metilpirazol
------------------------

**Nota:** Todos los reactivos fueron cotizados y suministrados por la casa Sigma-Aldrich® adquiridos con su representante en Colombia, con excepción de la Silica gel de la cual ya se disponía previamente la cantidad necesaria para el desarrollo del proyecto.

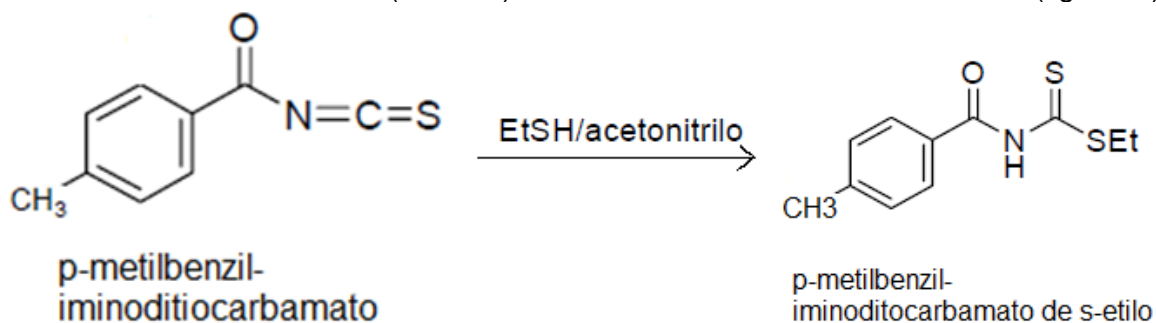
### 2.1.1 Descripción de la síntesis<sup>2,4</sup>.

Obtención **del aroliminoditiocarbamato de S,S-dietilo(primer etapa)**: una solución de tiocianato de potasio seco en acetonitrilo , se le agrega gota a gota cloruro de p-metilbenzoilo (figura 2).



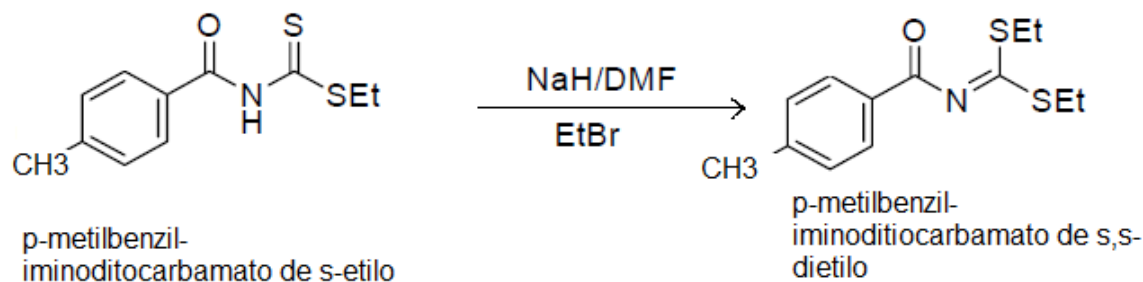
**Figura 2:** Reacción general para la obtención del p-metilbenzil-iminoditiocarbamato.

La mezcla se calienta en reflujo con atmosfera inerte durante 15 min. Pasado este tiempo, se deja enfriar la solución y se adiciona etanotiol en acetonitrilo manteniendo una agitación magnética durante 24h. Terminada la reacción se enfría en hielo triturado y se extrae con acetato de etilo (3x25mL) finalmente se recristaliza en etanol (figura 3).

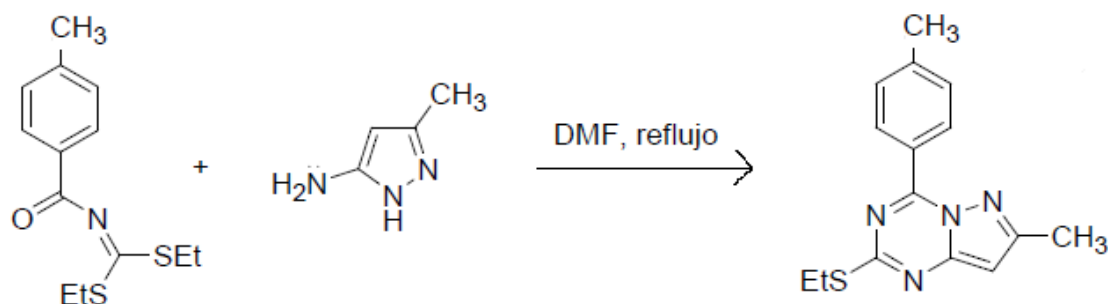


**Figura 3:** Reacción general para la obtención del p-metilbenzil-iminoditiocarbamato de S-etilo.

**Obtención del pirazolo [1,5-a] [1,3,5] triazina: 2-etiltio-7-metil-4-(4-metilfenil) pirazolo[1,5-a][1,3,5]triazina(segunda etapa).** Una solución equimolar de 5-amino-3metilpirazol y de p-metilbenzil-iminoditiocarbamato de S,S-dietilo en DMF. Se somete a reflujo durante 1.5h, transcurrido este tiempo se deja enfriar la solución y se procede a la precipitación del producto agregando lentamente agua fría. La purificación de producto principal se lleva a cabo por cromatografía de columna utilizando como eluyente hexano/acetato de etilo (8:2), posteriormente se evapora el solvente para la obtención del producto deseado. (figuras 4 y 5).



**Figura 4:** Reacción general para la obtención del p-metilbenzil-iminoditiocarbamato de S,S dietilo.



**Figura 5:** Reacción final para la obtención del compuesto 2-etiltio-7-metil-4-(4-metilfenil) pirazolo[1,5-a][1,3,5]triazina.

**Obtención de la sal del pirazolo [1,5-a] [1,3,5] triazina: 2-etiltio-7-metil-4-(4-metilfenil) pirazolo[1,5-a][1,3,5]triazina (tercera etapa):** El pirazolo [1,5-a] [1,3,5] triazina: 2-etiltio-7-metil-4-(4-metilfenil) pirazolo[1,5-a][1,3,5]triazina) es sometido a agitación en una solución de ácido clorhídrico al 5% hasta su solubilización.

**Confirmación de resultados para el compuesto obtenido:**

Una vez purificado el compuesto final este será evaluado por medio de <sup>1</sup>H-RMN, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400MHz (TMS-estándar interno) y <sup>13</sup>C-RMN DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100MHz (TMS-estándar interno). Con el fin de determinar que se obtuvo el compuesto MH4b.

**Estequiometría de la síntesis (segunda etapa):** el conteo de átomos nos da que; C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>NOS<sub>2</sub>+C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub> produce C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>S + C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>S+H<sub>2</sub>O Total C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>OS<sub>2</sub> = C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>OS<sub>2</sub>, por tanto la ecuación está balanceada, y esto lleva a que 1 mol de p-metilbenzil-iminoditiocarbamato de S,S-dietil produce 1mol de 2-etiltio-7-metil-4-(4-metilfenil) pirazolo[1,5-a][1,3,5]triazina). Para los efectos de esta síntesis se necesitaban 1085 mg de 2-etiltio-7-metil-4-(4-metilfenil) pirazolo[1,5-a][1,3,5]triazina), los cuales son equivalentes a 1085mg X 1mmol/284mg = 3.82mmol. Eso significa que se necesitarían sintetizar 3.82 mmoles de de p-metilbenzil-iminoditiocarbamato de S,S-dietil. Equivalentes a 1019,94 mg.

**Estequiometría de la síntesis (primera etapa):** C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>NOS<sub>2</sub> + C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>Br produce C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>NOS<sub>2</sub> + Br<sup>-</sup> + H<sup>+</sup> total= C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>NOS<sub>2</sub>Br = C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>NOS<sub>2</sub>Br por tanto se mantiene la

proporción 1:1 lo cual significa que se necesitan sintetizar 3.82mmol de p-metilbenzil-iminoditiocarbamato de S-etilo equivalentes a 3.82mmol X 207mg/mmol = 790.74mg.

**Nota:** se describe primero la estequiometria de la segunda etapa ya que químicamente es más fácil realizar cálculos partiendo de productos hasta llegar a reactivos. El porcentaje de rendimiento de la reacción es de aproximadamente el 70% para la obtención del MH4b, al realizar los cálculos estequiometros es innecesario tomar en cuenta las cantidades pesadas al momento de realizar la síntesis ya que al ser una relación 1:1 durante cada una de las etapas no hay necesidad de realizar cálculos de reactivo limite y reactivo en exceso.

## 2.2 Actividad anticonvulsivante

### 2.2.1 Animales.

Para cada uno de los ensayos se emplearon ratones machos ICR, criados y mantenidos en el Bioterio de experimentación del Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, con edad aproximada de 8 semanas y peso corporal entre 21 y 35 g, esto con el fin de facilitar la disponibilidad de animales para cada uno de los ensayos, ya que comprendía la población de animales menos utilizada en el departamento de farmacia. Los animales se encontraban con ciclos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, temperatura  $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ , con agua y comida a libre disposición, excepto 6 horas antes de la administración de los compuestos. Para todos los experimentos se siguió un diseño estadístico de bloques completos al azar, bloqueando según el peso del animal para controlar el "efecto-caja". Es decir, que en cada una de las cajas se encontraban animales tratados con cada una de las sustancias a evaluar. De esta manera se controla que factores externos que puedan llegar a afectar la respuesta lo hagan en forma similar en todos los animales que están alojados en la misma caja. Los animales, pasado el tiempo de observación, fueron sacrificados por dislocación cervical. Se determinó como protegido aquel animal que durante los 30 minutos posteriores a la estimulación no presentara convulsión.

### Descripción de la prueba.

#### 2.2.1 Convulsión inducida por electroshok de alta frecuencia.

Se utilizaron tres dosis del compuesto MH4b: 50, 150 y 300 mg/kg de peso, además de un control positivo al cual se le suministro fenitoína 20 mg/kg, v.o y control negativo el cual solo se le suministro suero fisiológico v.o. El intervalo de dosificación de MH4b se escogió con base en resultados previos (Estrada, 2010). Transcurridos 25 min de la administración de los tratamientos, cada animal recibió una descarga eléctrica de 50 mA, 60 Hz durante 0,2 a 0,3 milisegundos, vía corneal y se determinó si hubo protección frente a la extensión de los miembros posteriores como indicador de efecto anticonvulsivante. El volumen de administración fue de 0.1 ml/10 g de peso. Se determinó como protegido de la convulsión el animal en el que no se presentó la extensión tónica de las extremidades inferiores. La figura 8 muestra la presencia (+), ausencia (-) y supervivencia (+/-) de cada animal durante el evento.

#### 2.2.2 Convulsión inducida por pentilentetrazol.

Para esta prueba se utilizaron las mismas dosis del compuesto MH4b descritas en la convulsión inducida por electroshock de alta frecuencia. Como control positivo se utilizó

fenobarbital sódico 2.5 mg/kg v.o y como control negativo suero fisiológico. 25 minutos después de la administración del compuesto MH4b los ratones fueron inyectados con 65 mg/kg de peso del agente pentilentetrazol vía subcutánea en la zona interauricular. Se observó la aparición (+) o ausencia (-) de la convulsión durante 30 minutos. Se determinó como protegido de la convulsión el animal que en el periodo de 30 minutos posteriores a la administración de pentilentetrazol no presentó convulsión.

### **2.2.3 Convulsión inducida por picrotoxina y estriquina.**

Tanto para la prueba realizada con picrotoxina así como en la prueba con estriquina las dosis utilizadas del compuesto MH4b fueron equivalentes a 50, 150 y 300 mg/Kg de peso. El control negativo fue el mismo (al igual que en las pruebas anteriores), suero fisiológico estéril. Para el caso de la picrotoxina se utilizaron 3.5 mg/Kg de peso y el control positivo fue diazepam 10 mg/Kg de peso. En el caso de la estriquina se utilizó una dosis de 2.0 mg/Kg de peso y como control positivo se utilizó la dosis máxima de fenobarbital tolerada por los animales la cual equivale a 100 mg/Kg de peso. Tanto la estriquina como la picrotoxina se administraron 25 minutos después de haber administrado el compuesto MH4b. Posterior a la administración de la sustancia proconvulsivante (picrotoxina o estriquina), los animales fueron liberados en un campo abierto y observados durante 30 minutos para determinar la presencia (+) o ausencia (-) de la convulsión.

### **2.2.4 Convulsión inducida por electroshock de baja frecuencia.**

Al igual que en las pruebas anteriores las dosis utilizadas de MH4b fueron de 50, 150, y 300 mg/kg. Como control positivo se utilizó levetiracetam, 35 mg/Kg de peso<sup>6</sup>, como control negativo se utilizó suero fisiológico. 25 minutos después de la administración del compuesto MH4b y los controles, los animales, después de ser inmovilizados manualmente, fueron estimulados con una corriente eléctrica proveniente del estimulador programable E13-51 (*Coulbourn Instruments*), el cual se programó de la siguiente manera: pulsos rectangulares, positivos, de 0,2 ms de duración, tiempo entre pulsos de 166 ms y con una duración de estímulo total de 3 s. cumplido el tiempo de estimulación los ratones fueron liberados en campo abierto y se observaron durante 30 minutos para determinar la aparición (+) o ausencia (-) de la convulsión. Se determinó como protegido aquel animal que durante los 30 minutos posteriores a la estimulación no presentara sacudidas en cabeza, tronco, extremidades o extensión de la cola (signo de Straub) durante al menos cinco segundos<sup>6</sup>.

### **2.3 Neurotoxicidad. Ensayo en eje rodante.**

Para este caso el patrón, el cual cumple las funciones de control positivo, fue fenobarbital debido a que suele producir efectos adversos para el desarrollo de esta prueba, tales como sedación, ataxia, vértigo, insomnio, hipercinesia, depresión, agresividad y disfunción cognitiva.

Dos días antes del ensayo se llevaron a cabo dos sesiones de entrenamiento, de modo que cada animal lograra mantenerse en el eje (cilindro de 3 cm de diámetro a velocidad de 10 rpm) por un tiempo mínimo de 30 segundos. De esta forma se garantiza que el día de la prueba el animal esté preparado y acostumbrado a la misma.

El día de la prueba se hicieron tres mediciones: la primera antes de la administración de los tratamientos (tiempo cero); la segunda a los 60 minutos después de la administración de los tratamientos y la tercera después de 120 minutos; se anotaron los tiempos de



permanencia sobre el eje rodante.

Para esta prueba se eligió el tratamiento con la dosis más alta de compuesto MH4b (300 mg/kg) además del grupo patrón y grupo control. Los ratones utilizados fueron seleccionados de aquellos que durante el entrenamiento mostraron la capacidad de permanecer en el eje rodante por 30 segundos o más para un total de 5 animales por grupo.

#### **2.4 Consideraciones éticas.**

Las pruebas de convulsión sí producen daño neurológico, pero infortunadamente hasta el día de hoy, no existen pruebas *in vitro* que posean el suficiente valor predictivo que las reemplacen. Por este motivo se utilizó el número mínimo de animales por ensayo que permite una valoración estadísticamente adecuada del perfil anticonvulsivante del compuesto MH4b. Los animales se trataron con el debido cuidado, ajustado siempre a las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, establecidas en la Resolución No. 008430 de 1993, del Ministerio de Salud de Colombia.

#### **2.5 Diseño experimental y análisis estadístico.**

Se siguió una distribución de tratamientos completamente al azar para el modelo de convulsión por descarga eléctrica y para los modelos de convulsión química. Los tratamientos correspondientes fueron: las diferentes dosis administradas del compuesto MH4b, los patrones, y el vehículo como control. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante la prueba de Fisher, indicada cuando la variable de medición es de tipo dicotómica (protección o convulsión) y el tamaño de muestra es pequeño<sup>31</sup>. El nivel de confianza asumido fue de 95% ( $p < 0.05$ ).

#### **2.6 Resumen del protocolo general para la evaluación anticonvulsivante.**

**Tabla 4: Protocolo general para la evaluación anticonvulsivante.**

1. Pesar y distribuir por peso ratones ICR * macho de alrededor de 8 semanas de edad. Se utilizarán ratones entre los 25 y 35 gramos de peso.
2. Administrar la dosis a evaluar, equivalente para cada animal en relación a su peso del compuesto MH4b vía oral usando una jeringa de insulina con cánula adecuada para el tamaño del ratón.
3. Administrar la dosis equivalente para cada animal en relación a su peso del control positivo, vía oral usando una jeringa de insulina con cánula adecuada para el tamaño del ratón.

4. 25 minutos después de la administración del compuesto MH4b, se procede a administrar la sustancia proconvulsivante o aplicar el estímulo eléctrico y observar.

5. Registrar manifestaciones mioclónicas, tónicas, tónicoclónicas y generalizadas por un período de 30 minutos.

## Resultados

En este segmento se muestran los resultados obtenidos en cada uno de los ensayos y los parámetros evaluados para cada uno de los mismos.

### 3.1 Síntesis.

Siguiendo el protocolo previamente descrito se sintetizaron 1.5 g del compuesto MH4b, de esta cantidad se tomó una pequeña muestra (20 mg), para realizar los ensayos con el fin de convertirla en clorhidrato. Para medir si hubo o no pérdida de masa, se anotó el peso del beaker más 20mg del compuesto MH4b, lentamente fueron adicionados 30ml de una solución de HCl 5% se mantuvo en agitación por 24 horas, pasadas las 24 horas de agitación aún se observaba precipitado por lo cual se continuo la agitación. Pasadas aproximadamente 30 horas de agitación el precipitado fue solubilizado dando como resultado una solución amarillo-verdosa. Dicha solución fue calentada a 35°C hasta su total evaporación, dando como resultado unos cristales amorfos de color amarillo con olor y textura igual a la muestra sin tratamiento del compuesto MH4b. El peso inicial como el final no presentó modificaciones significativas salvo por unos microgramos los cuales pueden ser atribuidos a la incertidumbre de la balanza.

La solubilidad del compuesto se probó en suero fisiológico, el cual sirvió como vehículo para la aplicación de las dosis vía oral, arrojando resultados satisfactorios para la preparación de las diferentes dosis del compuesto MH4b a evaluar.

Haciendo una relación estequiométrica se procedió a la preparación de 1200 mg de clorhidrato para ser utilizado en cada una de las pruebas.

### 3.2 Ensayos experimentales de convulsión inducida.

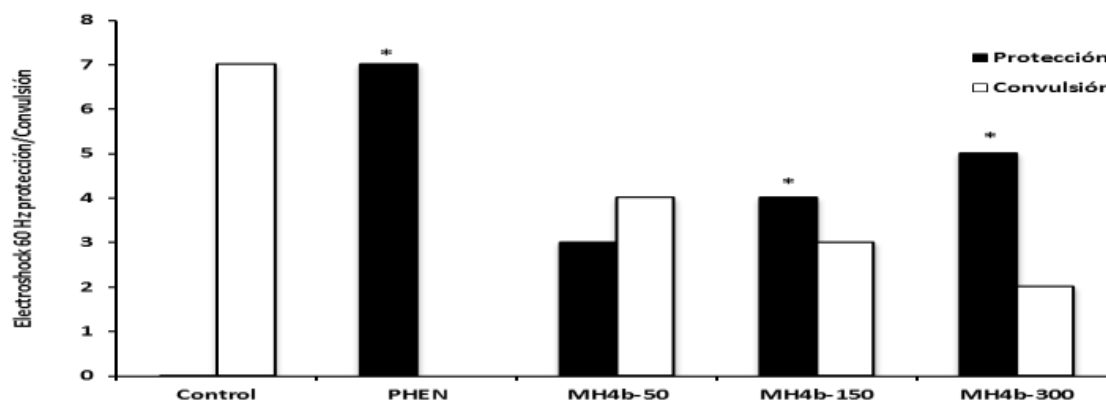
Los resultados se muestran en la Tabla 5. El compuesto MH4b mostró efectos protectores en función de la dosis en los modelos de convulsión inducida eléctricamente, tanto de alta frecuencia (60 Hz) como de baja frecuencia (6 Hz). Los patrones utilizados ejercieron efectos protectores en forma significativa, con excepción del modelo de estricnina.

<i>Prueba</i>	<i>Convulsión</i>	<i>Tratamiento</i>	<i>Dosis (mg/kg)</i>	<i>Protección</i>	<i>P&lt;0,05</i>
Descarga eléctrica de 60 Hz	Extensión tónica	SSN	(-)	0/7	(-)
		Fenitoína	20	7/7	*
		MH4b	50	3/7	NS
		MH4b	150	4/7	*
		MH4b	300	5/7	*
Pentilentetrazol	Mioclonias	SSN	(-)	0/7	(-)
		Clonazepam	0.5	6/7	*
		MH4b	50	0/7	NS
		MH4b	150	0/7	NS

		MH4b	300	0/7	NS
Picrotoxina	Mioclonias	SSN	(-)	0/7	(-)
		Diazepam	10	5/7	*
		MH4b	50	0/7	NS
		MH4b	150	0/7	NS
		MH4b	300	0/7	NS
Estricnina	Convulsiones clónicas o tónicas	SSN	(-)	0/7	(-)
		Fenobarbita I	2,5	0/7	NS
		MH4b	50	0/7	NS
		MH4b	150	0/7	NS
		MH4b	300	0/7	NS
Descarga eléctrica de 6 Hz	Estereotipias motoras	SSN	(-)	0/7	(-)
		Levetiracetam	35	6/7	*
		MH4b	50	0/7	NS
		MH4b	150	1/7	NS
		MH4b	300	4/7	*

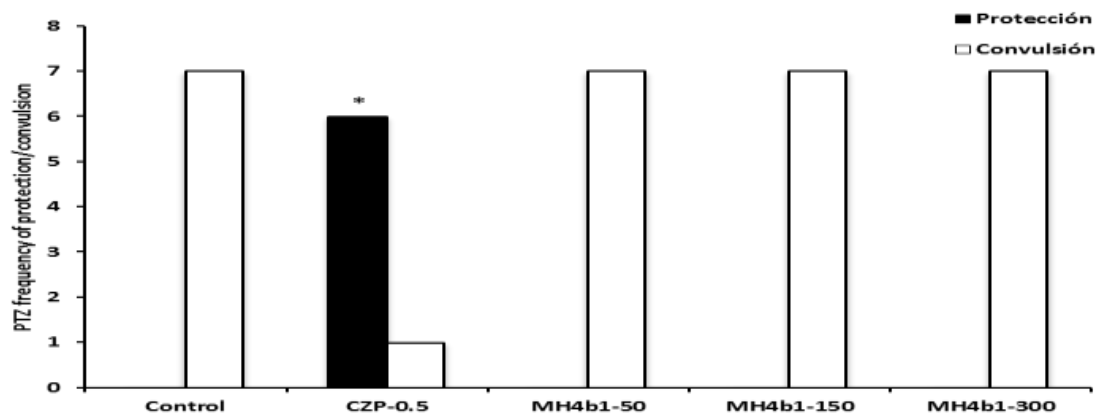
**Tabla. 5.** Actividad anticonvulsivante de la pirazolotriazina Mh4b en modelos de convulsión inducida experimentalmente en ratones albinos ICR ( $p < 0,05$  según el número de animales protegidos con respecto al control. \*: Significativo, NS: no significativo, n: 7 por grupo).

**Figura 6: Prueba de descarga eléctrica 60Hz.**



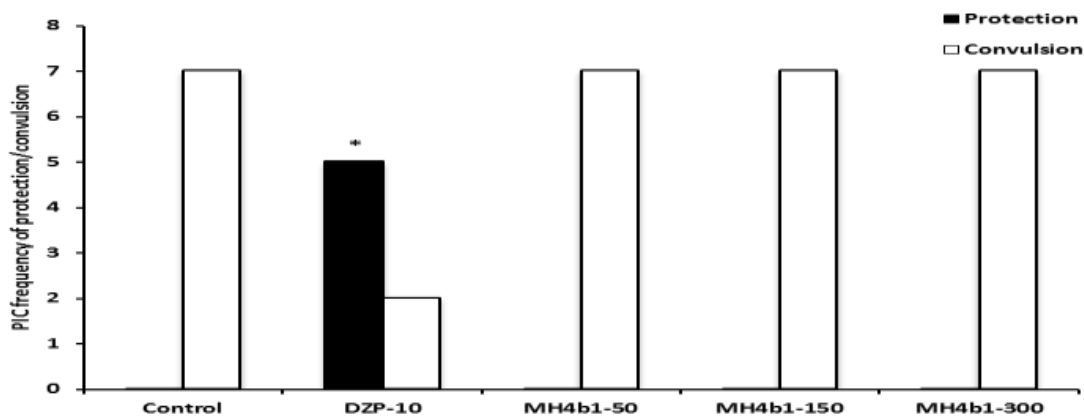
La figura 6 muestra el efecto protector a diferentes dosis del compuesto MH4b en la prueba de electroshock a 60Hz en la cual se evidencia que a dosis más altas mayor efecto protector frente al evento.

Figura 7: Prueba de convulsión inducida por Pentilentetrazol.



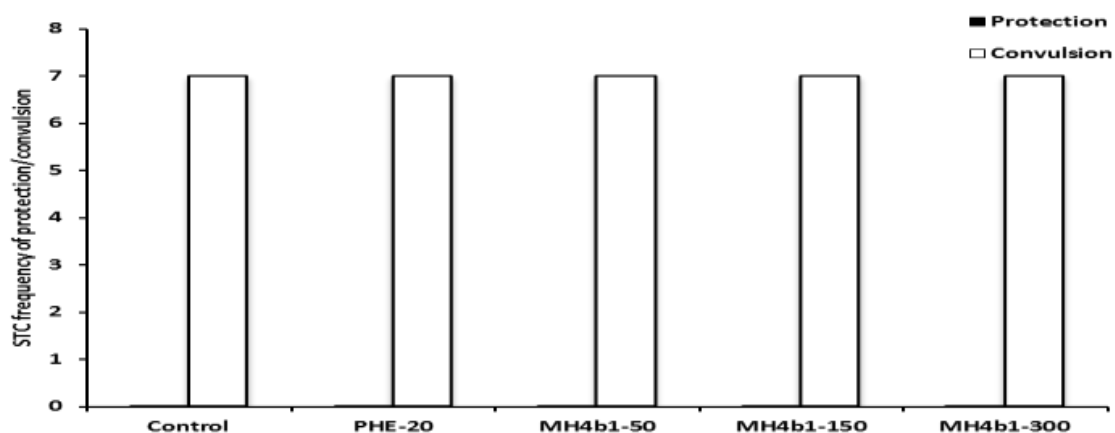
En la figura 7 se observa como el compuesto MH4b no presenta protección frente a la convulsión inducida por Pentilentetrazol.

Figura 8: Prueba de convulsión inducida por Picrotoxina.



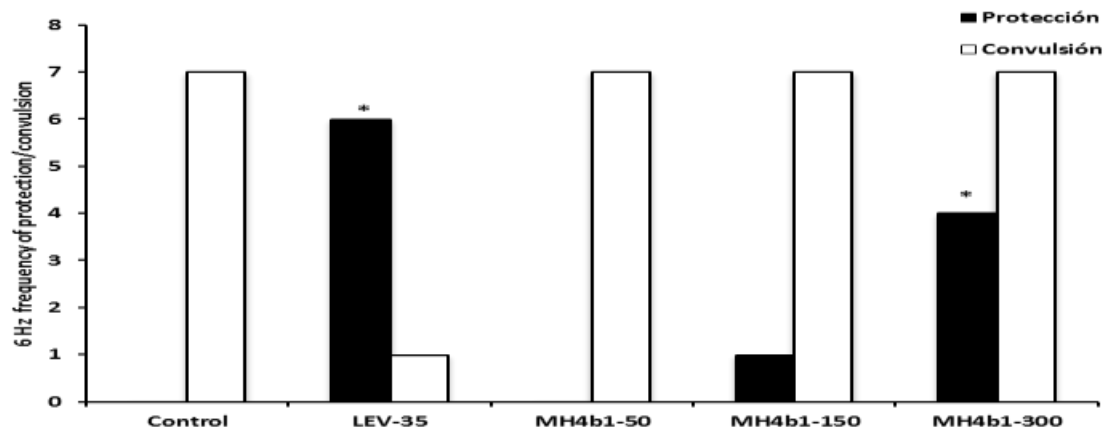
La figura 8 presenta los resultados obtenidos en la prueba de convulsión inducida por Picrotoxina, en la cual se observa que el compuesto MH4b no presenta protección frente al evento de convulsión

Figura 9: Prueba de convulsión inducida por Estricnina.



La figura 9 presenta los resultados obtenidos en la prueba de convulsión inducida por Estricnina, en la cual se observa que el compuesto MH4b no presenta protección frente al evento de convulsión

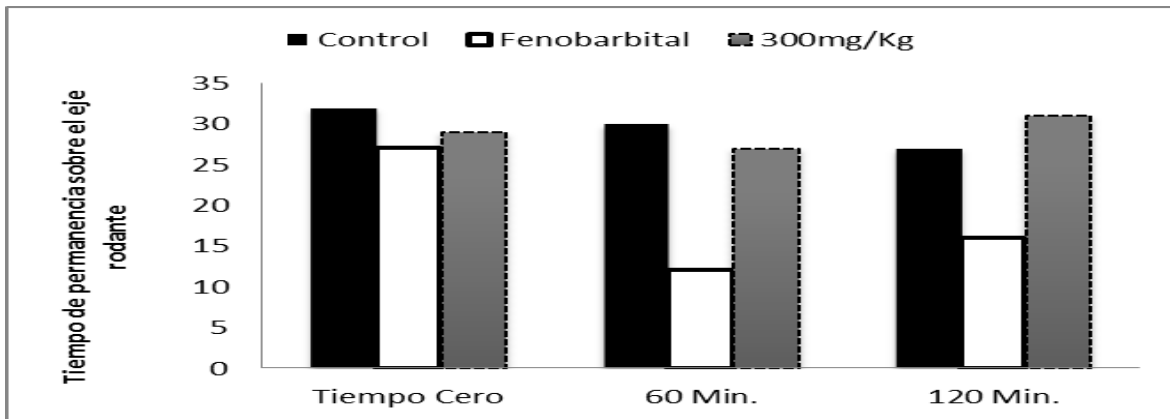
Figura 10: Prueba de Descarga eléctrica de 6 Hz.



La figura 10 muestra el efecto protector a diferentes dosis del compuesto MH4b en la prueba de electroshock a 6 Hz. En la cual la dosis equivalente a 300mg/Kg presento una protección significativa frente al evento de convulsión.

### 3.3 Neurotoxicidad. Ensayo en eje rodante.

Figura 11: Tiempos de permanencia. Eje rodante



La figura 11 muestra el promedio de tiempos de permanencia de cada uno de los grupos sometido a este ensayo en segundos, siendo la columna 1<sup>o</sup> el inicio de la prueba o tiempo 0, la columna 2<sup>o</sup> la permanencia de los animales sobre el eje rodante tomado a los 60 minutos y la 3<sup>o</sup> el tiempo de permanencia de los animales tomado a los 120 minutos para cada uno de los tratamientos. Promedio +/- EMS, n = 5. ANOVA, p < 0,05.

## Discusión

Observando los resultados obtenidos en cada uno de los ensayos y comparando dichos resultados con la bibliografía, podemos determinar un perfil de acción del compuesto MH4b y un posible mecanismo de acción del mismo. Para esto debemos tener en cuenta lo siguiente:

1. El compuesto MH4b fue efectivo en la prueba de convulsión inducida por electroshock de alta frecuencia en donde se puede observar claramente que hubo protección frente al evento en cada una de las dosis, siendo la más efectiva la dosis equivalente a 300 mg/kg de peso, sin embargo, también hay que resaltar que la dosis equivalente a 150 mg/kg de peso tuvo un comportamiento muy similar a la dosis anterior y su margen de protección frente a cada uno de los eventos de la convulsión también fue elevado a pesar de ser solo la mitad de la dosis anterior.
2. Para la convulsión inducida por electroshock de baja frecuencia, el compuesto MH4b mostro efectos protectores significativos con la dosis más alta 300 mg/kg.
3. En las pruebas de convulsión química inducidas por PTZ, picrotoxina y estricnina, el compuesto MH4b no mostró acción protectora frente al evento de convulsión, ni disminución en el número de eventos asociados a cada uno de estos tres ensayos.
4. El compuesto MH4b no mostro efecto neurotóxico en el ensayo de eje rodante, ya que no se observa diferencia significativa entre los controles negativos y los animales a los cuales se le administro la dosis más alta.

Teniendo en cuenta estos cuatro puntos anteriores y con base a la revisión bibliográfica del mecanismo de acción de cada uno de los patrones utilizados en los diferentes ensayos y el mecanismo de acción de otros patrones también eficaces en los distintos ensayos, se puede plantear que una aproximación al mecanismo de acción del compuesto MH4b es quizás un bloqueo de los canales de sodio y la corriente de calcio en la membrana neuronal o la inhibición/disminución de la acción de dichos canales dependientes de voltaje. Similar a la acción de los patrones utilizados en las pruebas de electroshock de alta y baja frecuencia.

Como en las pruebas de convulsión químicas inducidas por PNZ y picrotoxina, el mecanismo de acción de los patrones utilizados en estas pruebas (fenobarbital y diazepam), actúan principalmente sobre el sistema Gabaergico, y ya que el compuesto MH4b no posee acción protectora en estos ensayos, hay elementos para afirmar que el mecanismo de acción del compuesto MH4b no actúa o interviene en la convulsión asociada este sistema. Esto quedó comprobado con los resultados obtenidos en el ensayo de unión al sitio de benzodiazepinas sobre receptor GABA-A<sup>31</sup>.

Cabe considerar que los efectos anticonvulsivantes de MH4b se deban (además de otros mecanismos asociados), a sus propiedades inhibitorias de MAO-B<sup>31</sup>. Zonizamida, y safinamida son ejemplos de agentes anticonvulsivantes con mecanismos vinculados con la inhibición de MAO-B<sup>31</sup>. También es notable que el compuesto MH4b haya arrojado efectos significativos en el modelo de convulsión eléctrica de baja frecuencia, modelo de las crisis refractarias, porque es precisamente éste uno de los principales retos de la neurofarmacología en el campo de la epilepsia, encontrar agentes útiles para el manejo de las crisis que no responden a la terapia convencional<sup>34</sup>.



También cabe decir que al no presentar ningún tipo de acción anticonvulsivante en la prueba de convulsión química inducida por estriknina, se puede prever que el mecanismo de acción del compuesto MH4b no se asocia a los mecanismos de neurotransmisión asociados con la glicina.

Por otra parte, a pesar de haber mejorado notablemente la solubilidad del compuesto MH4b al ser convertido en clorhidrato, no se evidenciaron mejoras significativas en su eficiencia, ya que los resultados obtenidos con las diferentes dosis del compuesto MH4b son similares a los obtenidos en la tesis de Estrada (2010). Esto quizás es debido al hecho de que al convertir el compuesto MH4b en un clorhidrato se facilitó su vía de administración, disolución y absorción, sin que por ello se hubiera incrementado su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica.

De igual manera, la evidencia apunta a que el compuesto MH4b no posee efectos neurotóxicos agudos, esto sustentado en que no se evidenció diferencia significativa frente al control en la prueba de neurotoxicidad del eje rodante, al menos en el intervalo de dosis evaluado.

## Conclusiones

### 5.1 Conclusiones.

- El compuesto MH4b tendría un perfil anticonvulsivante dirigido hacia el control de las crisis tónicas clónicas generalizadas, y hacia las crisis parciales refractarias, en vista de su efectividad en los modelos de convulsión inducida con corrientes de alta y de baja frecuencia.
- MH4b estaría desprovisto de efectos neurotóxicos agudos.

## Recomendaciones.

Ya que el compuesto MH4b tendría un perfil anticonvulsivante dirigido al control de las crisis tónico clónicas generalizadas y de las crisis parciales refractarias, vale la pena profundizar en su mecanismo de acción ya sea por medio de pruebas *in silico* que relacionen estructura actividad aprovechando el gran avance en materia de la bioinformática o realizando pruebas específicas de unión a canales y receptores de activación dependientes de voltaje, entre ellos canales de sodio y de calcio. Esto, porque cabe plantear que el compuesto MH4b podría ejercer mecanismos adicionales a los de la inhibición de MAO-B.

## Bibliografía

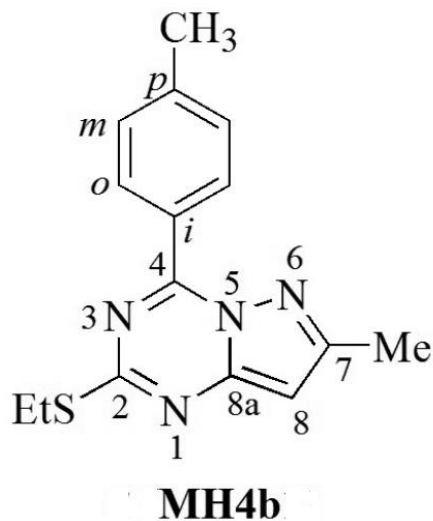
1. Fandiño J, Corpus C. In Colombia and Some Reflections on Care and Research Among the Poor in Developing Countries. *Epilepsia* 2000; Vol 41, Suppl. 4: pag. 22-27.
2. Insuasty H, Estrada M, Cortés E, Quiroga J, Insuasty B, Abonía R, Nogueras M, Cobo J; Regioselective Synthesis of novel 4-aryl-2-ethylthio-7-methyl pyrazolo[1,5-a]-[1,3,5]-triazines. *Tetrahedron Letters*; 2006, 47 5441–5443
3. Estrada M. Valencia, Efectos Neurofarmacologicos De Análogos De Pirazolo[1,5-a][1,3,5]Triazinas, Tesis de grado para optar al título de Magíster en Ciencias Farmacéuticas, Universidad Nacional De Colombia Sede Bogotá. 2010.
4. Barton, Klein, Wolf, While, Pharmacological characterization of the 6 Hz psychomotor seizure model of partial epilepsy, *Epilepsy Res*, 47, 217–227 (2001).
5. Nadezdha E. Vergel. Estudio de la actividad anticonvulsivante de metabolitos secundarios tipo cumarina. Tesis de grado para optar el título de Doctorado en Ciencias Farmacéuticas. Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, 2011.
6. Engel J Jr, McDermott M, Wiebe S, Langfitt J, Stern J, Dewar S. Early surgical therapy for drug-resistant temporal lobe epilepsy: a randomized trial. *JAMA*. 2012 Mar 7. 307(9):922-30.
7. Sharpless S.K., Hypnotics and Sedatives I: The Barbiturates. In: Goodman L.S., Gilman A. Eds. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. London: The Macmillan Company, 1971: 98 – 120.
8. Heitmann B., Representations of Epilepsy as the Healing and Possessed. In: Lüders H.O. ed. *Epilepsy Surgery*. New York: Raven Press, 1992: 1-5.
9. RANG Y DALE. *Farmacología*. Sexta edición. Ed. Elsevier. Cap. 40, pag. 575-584.
10. Palacio D, Alvarado E, Sánchez J. Estudio Nacional de Salud Mental 203. Editado por el Ministerio de la Protección Social y Fundación FES Social. Cali. Diciembre de 2005.
11. Goodkin HP. The founding of the American Epilepsy Society: 1936-1971. *Epilepsia*. 2007 Jan. 48(1):15-22.
12. Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*. 2005 Apr. 46(4):470-2.
13. Kramer MA, Cash SS. Epilepsy as a disorder of cortical network organization. *Neuroscientist*. 2012 Aug. 18(4):360-72.
14. Meldrum B. neurotransmission in epilepsy. *Epilepsia*, 1995, vol 36, suppl. 1, pag. 30-35.
15. Berg A, Berkovic S, Brodie M. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*. 2010 Apr. 51(4):676-85.
16. Beghi E. The concept of the epilepsy syndrome: how useful is it in clinical practice?. *Epilepsia*. 2009 May. 50 suppl 5:4-10.
17. Mattson R, Cramer J, Collins J. Comparison of carbamazepine, phenobarbital, phenytoin, and primidone in partial and secondarily generalized tonic-clonic seizures. *N Engl J Med*. 1985 Jul 18. 313(3):145-51.
18. Gupta A, Wan Y, MArkran H. Organizing principles for a diversity of gabaergic interneurons and synapses in the neocortex. *Science*, 2000, 287, jan. pag. 273-277.

19. Heckers S, Rausch S, Gooff D. Impaired recruitment of hippocampus during conscious recollection in schizophrenia. *Nature Neuroscience*. 1998, 1, 318-323.
20. Ben-Ari Y. Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nature neuroscience*. 2002, vol 3, sep, pag. 715-727.
21. Queiroz, C., Leite, J. y Mello, L. Modelos experimentales en epilepsia, SBPC/Labjor Brasil. 2002
22. Current Protocols in Pharmacology I-II Copyright © 1998 by John Wiley & Sons, Inc 1998. pag 1583-1587.
23. Vogel Gerard. Editor. Drug Discovery and Evaluation. Pharmacological Assays. Chapter E 2.2. Anticonvulsant activity. Second edition. Ed. Springer. Germany.P. 2002. 422-425..
24. Stables James, Kupferberg Harvey; Molecular and cellular targets for anti-epileptic drugs, chapter 16: The NIH Anticonvulsant Drug Development ADD Program: preclinical anticonvulsant screening project; John Libbey Eurotext 1997; 191-199.
25. Abstract. Bohme I y Luddens H. The inhibitory circuitry as target of antiepileptics drugs. *Current Medicinal Chemistry*, 2001, vol 8, pag. 1257-1274.
26. Huang, S. Lin, R. Yu, Y. Lu, Y. Connolly, P. Chiu, G. Li, S.; Emanuel, S. Middleton, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2007, 17,1243-1245; (b) Mukaiyama, H.; Nishimura, T.; Kobayashi, S. Komatsu, Y. *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, 16, 909-921. (c) Tsai, P.C.. Wang, I.J. *Dyes Pigments*, 2008, 76, 575-581.
27. Nelson, J. Leopold, W. Connors, R.; Bridges, A. *Science*, 1994, 265, 1093-1095; (b) Insuasty, B. Torres H.; Quiroga, J. Abonía, R. Noguerras, M. Sánchez, A. Sortino M. Zacchino S. Low J. *Heterocyclic Commun.* 2003, 9(2), 153.
28. [Guia en línea] Harden CL, Hopp J, Ting TY, et al, for the AAN and AES. Management issues for women with epilepsy-Focus on pregnancy (an evidence-based review): I. Obstetrical complications and change in seizure frequency: Report of the Quality Standards Subcommittee and Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology and the American Epilepsy Society. *Epilepsia*. 2009 May. 50(5):1229-36.
29. Elgemeie, G.; Fathy, N. *Tetrahedron*, 1995, 51, 3345-3350.
30. Scala, S.; Akhmed, A.; Rao, U.; Paul, K.; Lan, L.; Dickstein, B.; Lee, I.; Elgemeie, G.; Stein, W.; Bates, S. *Mol. Farmacol.*, 1997, 51, 1024-1033.
31. Estrada M, Insuasty H, Cuca L, Guerrero M, Anticonvulsant effect of 2-ethylthio-7-methyl-4-(4-methylphenyl) pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazine, Proceedings of the British Pharmacological Society at <http://www.pA2online.org/abstracts/Vol8Issue1abst101P.pdf>.
32. Grover N, Limaye R, Gokhale D, Patil T. Zonisamide: a review of the clinical and experimental evidence for its use in Parkinson's disease. *Indian J Pharmacol*. 2013 Nov-Dec; 45(6):547-5.
33. Shakhidoyator, K. M. Eripor, E. Yun, L.M. Yamankulov, M. Ya and Kadyrov, Ch. Sh. *Fungitsidy*, 1980, 66; *Chem. Abstr.*, 1981, 94, 192-253.
34. Potschka H. Animal models of drug-resistant epilepsy. *Epileptic Disord*. 2012 Sep; 14(3):226-34.

## Anexos

### Anexo A: Tablas de datos y espectros de los RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C tomados al compuesto MH4b posterior a su síntesis.

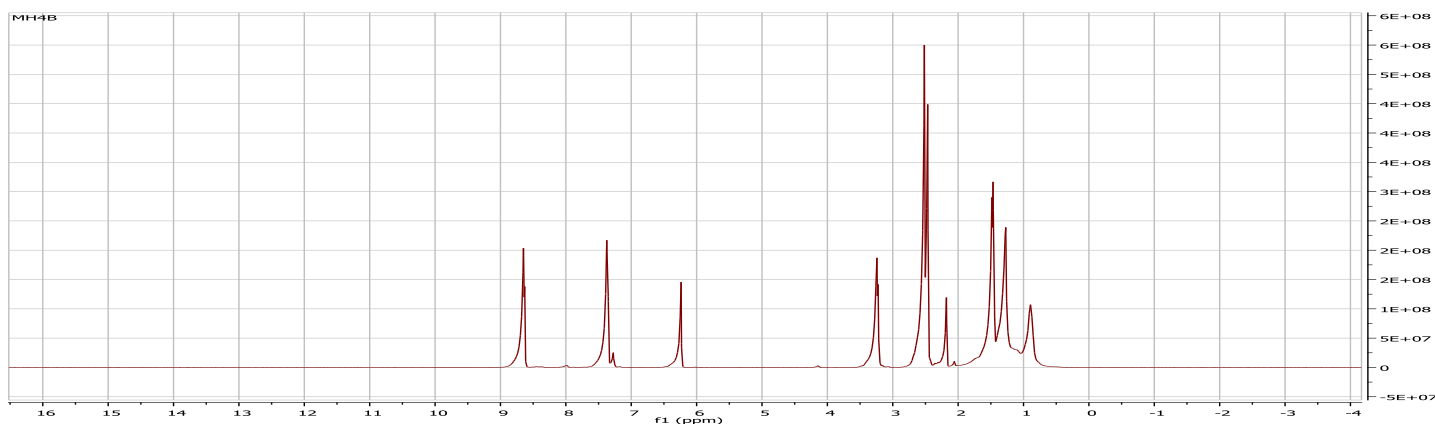
**Figura 12:** Asignación de numeración atómica al compuesto final MH4b para la interpretación de los espectros de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C.



**Tabla 6:** Asignación de señales del espectro de RMN <sup>1</sup>H tomado compuesto MH4b.

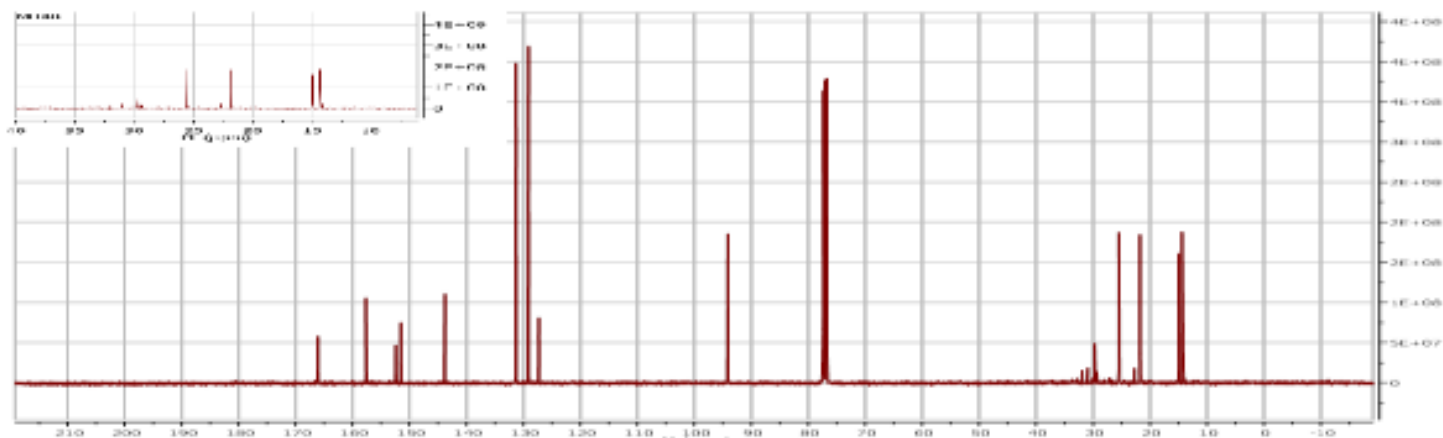
compuesto	Formula	Grupo Tioetilo		7-CH <sub>3</sub> (s)	8-H(s)	Grupo Arilo		
		CH <sub>3</sub> (t)	CH <sub>2</sub> (c)			H <sub>o</sub> (d)	H <sub>m</sub> (d)	CH <sub>3</sub> (t)
MH4b	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> S	1.5	2.5	2.1	3.2	8.5	6.1	7.5

Espectro 1: Datos de <sup>1</sup>H-RMN de **MH4b**. DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400MHz (TMS-estándar interno)



**Tabla 7:** asignación de picos del espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  tomado al compuesto MH4b

Tipo de átomo de carbono	Desplazamiento
$\text{CH}_3$ (tioetilo)	14.5
$\text{CH}_2$ (tioetilo)	22.1
7- $\text{CH}_3$	15
C-2	166
C-4	152
C-7	156
C-8	94
$\text{CH}_3$ (arilo)	21.75
Ci	127.3
Co	131.75
Cm	129.5
Cp	143

Espectro 2: Datos de  $^{13}\text{C}$ -RMN de **MH4b**, DMSO- $d_6$ , 100MHz (TMS-estándar interno)

## **Anexo B: Producción Científica**

- Perfil anticonvulsivante del compuesto 2-etiltio-7-metil-4-(4-metilfenil) pirazolo[1,5-A][1,3,5]triazina en modelos experimentales en ratones. Juan Camilo Escobar Bueno, Luis Enrique Cuca Suárez, Mario Francisco Guerrero Pabón. XIV Congreso Colombiano de Farmacología y Terapéutica. Ibagué, 2013.
- Assessment of the anticonvulsant activity of pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazines obtained by synthesis. Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas, Vol. 43 (1), 22-38, 2014.