

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA

Pricila Fernandes Pflüger

**AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO E DO PERFIL NEUROPROTETOR DA
GAMA-DECANOLACTONA EM EPILEPSIA E PARKINSON**

Porto Alegre

2021

Pricila Fernandes Pflüger

**AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO E DO PERFIL NEUROPROTETOR DA
GAMA-DECANOLACTONA EM EPILEPSIA E PARKINSON**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Farmacologia e Terapêutica.

Orientadora: Prof^a. Dra. Patrícia Pereira

Coorientador: Prof. Dr. José Ángel Fontenla Gil

Porto Alegre

2021



TESIS DE DOCTORADO

**EVALUACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN Y EL
PERFIL NEUROPROTECTOR DE LA GAMMA-
DECANOLACTONA EN EPILEPSIA Y PARKINSON**

Pricila Fernandes Pflüger

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE MEDICAMENTOS

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2021



DECLARACIÓN DEL AUTOR/A DE LA TESIS

Dña. **Pricila Fernandes Pflüger**

Título da **EVALUACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN Y EL PERFIL NEUROPROTECTOR DE LA**
tese: **GAMMA-DECANOLACTONA EN EPILEPSIA Y PARKINSON**

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
- 2) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
- 3) Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.
- 4) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide la versión impresa con la presentada en formato electrónico.

Y me comprometo a presentar el Compromiso Documental de Supervisión en el caso que el original no esté depositado en la Escuela.

En **Santiago de Compostela, 03 de mayo de 2021.**

Firma electrónica



AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR/TUTOR DE LA TESIS

D./Dña. **José Ángel Fontenla Gil**

En condición de: **Tutor/a y director/a**

Título de la tesis: **EVALUACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN Y EL PERFIL NEUROPROTECTOR DE LA GAMMA-DECANOLACTONA EN EPILEPSIA Y PARKINSON**

INFORMA:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por Dña. **Pricila Fernandes Pflüger**, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director/tutor de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

En **Santiago de Compostela (España)**, 03 de mayo de 2021

Firma electrónica



AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR/TUTOR DE LA TESIS

D./Dña. **Patrícia Pereira**

En condición de: **Director/a**

Título de la tesis: **EVALUACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN Y EL PERFIL NEUROPROTECTOR DE LA GAMMA-DECANOLACTONA EN EPILEPSIA Y PARKINSON**

INFORMA:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por Dña. **Pricila Fernandes Pflüger**, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director/tutor de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

En **Canoas (Brasil)**, 03 de mayo de 2021

Firma electrónica



DECLARACIÓN SOBRE CONFLICTO DE INTERESES

Dña. Pricila Fernandes Pflüger declara que, de acuerdo con las directrices de la Escuela de Doctorado Internacional en Ciencias de la Salud de la Universidade de Santiago de Compostela (acuerdo de 3 de mayo de 2018), no ha tenido ni tiene ningún posible conflicto de intereses en relación con la presente tesis doctoral.

En Santiago de Compostela, 3 de mayo de 2021.

Fdo. Pricila Fernandes Pflüger



Esta tesis doctoral ha sido financiada por la Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; subvención número 88881.198095/2018-01), por el Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; concesión número 304661/2016-3) y por la Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), de Brasil. En esta tesis se ha utilizado la infraestructura de la UFRGS y de la Universidade de Santiago de Compostela (USC), España.

La autora ha disfrutado de la siguiente financiación personal:

- 01-10-2016 hasta 01-09-2018. Becaria del programa de demanda social de la Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; proceso n°: 88882.438897/2018-01), Brasil.
- 01-10-2018 hasta 30-09-2019. Becaria del programa de doutorado sanduíche no exterior (PDSE; proceso n°: 88882.438897/2018-01), CAPES, Brasil.
- 01-10-2019 hasta 31-03-2021. Becaria del programa de demanda social de la CAPES (proceso n°: 88882.438897/2018-01), Brasil.

Parte de este trabajo ha sido publicado/enviado:

- Gamma-decanolactone attenuates acute and chronic seizures in mice: a possible role of adenosine A_1 receptors. *Behav Pharmacol.* 2020, Sep; 31(6):544-552. doi: 10.1097/FBP.0000000000000554. Con permiso de Wolters Kluwer Health, Inc. (Número de licencia 5093670790393).
Revista Behavioural Pharmacology. Factor de impacto: 1.741. Posición relativa en la categoría a la que pertenece y/o otros indicios de calidad: Año 2019, 218/271 Q4.
Contribución de la doctoranda: Conceptualización, metodología, validación, análisis formal, investigación, redacción - borrador original.
- Gamma-decanolactone: Preliminary evaluation as potential antiparkinsonian drug. *Eur J Pharmacol.* Enviado. Aún no ha sido publicado.



Revista European Journal of Pharmacology. Factor de impacto: 3.263. Posición relativa en la categoría a la que pertenece y/o otros indicios de calidad: Año 2019: 96/281 Q2.

Contribución de la doctoranda: Conceptualización, metodología, validación, análisis formal, investigación, redacción - borrador original.

Parte de este trabajo ha sido comunicado a:

- Neuroscience 2018 – Society for Neuroscience Annual Meeting. Adenosine A₁ receptor antagonism reduces the effect of gamma-decanolactone on acute and chronic seizures in mice. 3-7 November, 2018 – San Diego, CA, US.
- VII Encontro da Mocidade Investigadora. Estudio neurofarmacológico de gamma-decanolactona como potencial agente antiparkinsoniano. 27-29 Mayo, 2019. Santiago de Compostela, ES.
- 39th Spanish Society of Pharmacology Meeting. Gamma-decanolactone as selective MAO-B inhibitor in Parkinson's disease treatment. 3-5 July, 2019 - Las Palmas de Gran Canaria, ES.
- II Annual CiMUS Workshop. Gamma-decanolactone as MAO-B partially reversible inhibitor in Parkinson's disease treatment. 12 July, 2019. Santiago de Compostela, ES.

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a Dios por la vida y por hacerme creer que a pesar de los días difíciles y todos los obstáculos en este camino podría superar cada uno de ellos.

De manera especial quiero agradecer a mis padres (Rosane y Kort) por todo el amor, educación, libertad, coraje y apoyo que me han dado desde siempre, aunque estén lejos. De la misma manera agradezco a mi hermana (Carolina) por las conversaciones y consejos. Las palabras no son suficientes para expresar lo agradecida que estoy con esta familia que amo tanto.

A mi novio, Antonio, que hizo los días más felices y me dio la fuerza para seguir adelante. Sin su amor, cuidado, apoyo y confianza esto no habría sido posible. Gracias de corazón por todo, principalmente por la comprensión en estos últimos meses de tesis y por compartir tu familia y amigos conmigo.

Agradezco a mi directora de la tesis, la Dra. Patrícia Pereira, por abrirme las puertas de la posgraduación, por la bienvenida en su grupo de investigación, la orientación, el conocimiento y la amistad. También por haberme incentivado a hacer una estancia de investigación en la USC y mostrarme esta ciudad maravillosa. Gracias por la confianza.

A mi director/tutor de la tesis, el Dr. José Ángel Fontenla, por haberme aceptado en su grupo de investigación. Su orientación y conocimiento me han convertido en una mejor investigadora. Gracias por toda su paciencia y sugerencias aportadas en corregir la tesis e incentivo para realizar la cotutela.

Gracias a la Dra. Dolores Viña por haberme recibido en su laboratorio durante 3 meses y por dejarme formar parte de su equipo y aprender nuevas técnicas experimentales. Gracias por todo el conocimiento aportado. Estoy agradecida también a sus alumnos (Tadeu, Sandra, Paula, Pati, Fran y Ana).

A mis amigas de toda la vida (Miga, Fê, Jú, Cristi, Cíntea, Lívía y tía Rose), a las amigas de Porto Alegre (Simone, Leti, Andrya, Cami, Carol, Cla y Jú), a los que vinieron a Santiago (Mamá, Jú, Laísa, Fhaira, Kelvin, Gabi y Alex), a los amigos del PDSE (en especial a Fran y Ricardo) y a los amigos de Santiago (María, Raúl, Jacobo, Djalma y Olalla). Gracias por hacer la vida más fácil.

A los profesores, compañeros de clase y secretaria (Marilisa) del PPGFT. Gracias por todo el apoyo. A Salete, del sector de convenios, y a la vicerrectora (Dra. Patricia Pranke) de la UFRGS por posibilitar la firma del convenio de cotutela.

A María del EDIUS-USC. Gracias también por posibilitar la firma del convenio de cotutela y por toda la paciencia.

A los compañeros del laboratorio LABNET (Gabi, Letícia, Fê, Jordana, Débora, Mari, Wesley, Lu y Elen). Gracias por toda la ayuda y amistad.

A la técnica del departamento de Farmacología de la UFRGS, Chris Krebs. Gracias por la ayuda en la técnica de *Western blotting*.

Al grupo de investigación BioFarma. Gracias por posibilitar la realización del ensayo de *binding*.

Al laboratorio de Ingeniería Eléctrica y Electrónica. Gracias por posibilitar la realización del ensayo de *molecular docking*.

A CAPES. Gracias por las becas de doctorado y doctorado sándwich.

A todos, gracias.

ÍNDICE

1. RESUMEN	29
1.1 RESUMEN EN CASTELLANO	30
1.2 ABSTRACT IN ENGLISH	33
1.3 RESUMO EN GALEGO	35
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	43
2.1 INTRODUCCIÓN	44
2.2 EPILEPSIA	46
2.2.1 Clasificación de la epilepsia	47
2.2.2 Epileptogénesis	48
2.2.3 Fisiopatología de la epilepsia	50
2.2.4 Glutamato (Glu) y GABA	52
2.2.5 Adenosina	55
2.2.6 Papel de los principales neurotransmisores en la epilepsia	58
2.2.7 Fármacos antiepilépticos	60
2.2.8 Modelos experimentales de epilepsia	66
2.3 ENFERMEDAD DE PARKINSON	68
2.3.1 Fisiopatología de la enfermedad de Parkinson (EP)	71
2.3.2 Dopamina y receptores dopaminérgicos	73
2.3.3 Fármacos antiparkinsonianos	77
2.3.4 Modelo de reserpina	82
2.4 NEUROINFLAMACIÓN	83
2.5 GAMMA-DECANOLACTONA	84
3. JUSTIFICACIÓN	87
4. OBJETIVOS	91
4.1 OBJETIVO GENERAL	93

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	93
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	95
5.1 ESTUDIOS COMPUTACIONALES (IN SILICO).....	97
5.1.1 Predicción de las propiedades fisicoquímicas.....	97
5.1.2 Predicción de la capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica.....	98
5.1.3 Estudio de <i>molecular docking</i> sobre las isoformas MAO.....	99
5.2 ESTUDIOS IN VITRO.....	99
5.2.1 Estudios de la actividad inhibidora de la MAO.....	99
5.2.1.1 Fármacos y reactivos.....	99
5.2.1.2 Determinación de la inhibición de las isoformas de la MAO.....	100
5.2.1.3 Reversibilidad de la inhibición de la MAO-B.....	102
5.2.1.4 Expresión de los resultados, análisis estadístico y representación gráfica.....	103
5.2.2 Cultivo de células hepáticas HepG2.....	103
5.2.2.1 Determinación de la citotoxicidad.....	104
5.2.2.2 Expresión de los resultados, análisis estadístico y representación gráfica.....	105
5.2.3 Evaluación de la unión de la gamma-decanolactona a receptores de adenosina.....	105
5.2.3.1 Receptores de adenosina A ₁	105
5.2.3.2 Receptores de adenosina A _{2A}	106
5.2.3.3 Receptores de adenosina A _{2B}	106
5.2.3.4 Receptores de adenosina A ₃	107
5.3 ESTUDIOS IN VIVO.....	107
5.3.1 Animales.....	107
5.3.2 Evaluación del efecto anticonvulsivo de la gamma-decanolactona.....	109
5.3.2.1 Fármacos y reactivos.....	109
5.3.2.2 Diseño experimental.....	109
5.3.2.2.1 Protocolo farmacológico de crisis epilépticas agudas.....	109
5.3.2.2.2 Protocolo farmacológico de crisis epilépticas subcrónicas (Kindling).....	111

5.3.2.3 Eutanasia y recogida de los tejidos.....	113
5.3.3 Evaluación del efecto antiparkinsoniano de la gamma-decanolactona.....	114
5.3.3.1 Fármacos y reactivos.....	114
5.3.3.2 Protocolo farmacológico y diseño experimental.....	114
5.3.3.2.1 <i>Ensayo de la coordinación motora - Rota-rod test</i>	115
5.3.3.2.2 <i>Modificación de la temperatura corporal</i>	116
5.3.3.2.3 <i>Ensayo de la actividad locomotora - Open Field Test (OFT)</i>	117
5.3.3.3 Expresión de los resultados, análisis estadístico y representación gráfica.....	118
5.4 ESTUDIO EX VIVO.....	119
5.4.1 Reactivos.....	119
5.4.2 Preparación de las muestras.....	119
5.4.3 Ensayo de <i>Western blotting</i>.....	119
5.4.4 Expresión de los resultados, análisis estadístico y representación gráfica.....	120
6. RESULTADOS.....	121
6.1 ESTUDIOS COMPUTACIONALES (<i>IN SILICO</i>).....	123
6.1.1 Predicción de las propiedades fisicoquímicas.....	123
6.1.2 Predicción de la capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica.....	125
6.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTICONVULSIVO DE LA GAMMA-DECANOLACTONA.....	126
6.2.1 Crisis epilépticas agudas.....	126
6.2.2 Crisis epilépticas subcrónicas (<i>Kindling</i>).....	128
6.2.3 <i>Western blotting</i>.....	131
6.2.4 Evaluación de la unión de la gamma-decanolactona a receptores de adenosina.....	134
6.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIPARKINSONIANO DE LA GAMMA-DECANOLACTONA.....	135
6.3.1 Determinación de la inhibición de las isoformas de la MAO.....	135
6.3.2 Reversibilidad de la inhibición de la MAO-B.....	136

6.3.3 Estudio de <i>molecular docking</i> sobre las isoformas MAO.....	137
6.3.4 Actividad citotóxica de la gamma-decanolactona en células hepáticas HepG2.....	139
6.3.5 Ensayo de la coordinación motora - <i>Rota-rod test</i>	140
6.3.6 Modificación de la temperatura corporal.....	142
6.3.7 Ensayo de la actividad locomotora - <i>Open Field Test (OFT)</i>	143
7. DISCUSIÓN.....	147
8. CONCLUSIONES.....	159
9. BIBLIOGRAFIA.....	163

LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
3-OMD	3-O-metildopa
4-AP	4-aminopiridina
5-HT	5-hidroxitriptamina o serotonina
6-OHDA	6-hidroxidopamina
A	Adrenalina
Abs	Absorbancia
AC	Adenililciclase
ACh	Acetilcolina
ACV	Accidentes cerebrovasculares
ADK	Adenosina quinasa
ADME	Absorción, distribución, metabolismo y eliminación
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADP	<i>Adenosine diphosphate</i> - Adenosina difosfato
AMP	<i>Adenosine Monophosphate</i> - Monofosfato de adenosina
AMPc	<i>Adenosine 3', 5'-Cyclic Monophosphate</i> - Adenosina 3', 5'-Monofosfato Cíclico
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
Amplex Red	10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina
AMINOPH	<i>Aminophylline</i> - Aminofilina
ANOVA	Análisis de varianza
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ASDs	<i>Antiseizure drugs</i> - Medicamentos anticonvulsivos
ASP	<i>Anticonvulsant screening Project</i> - Proyecto de detección de anticonvulsivos
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> - Trifosfato de adenosina
ATPasa	Adenosinatrifosfatasa
B ₆	Piridoxina

BBB/BHE	<i>Blood Brain Barrier</i> - Barrera Hematoencefálica
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i> - Factor neurotrófico derivado del cerebro
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> - Albúmina de suero bovino
BZ	Benserazida
Ca ²⁺	Calcio
CB ₁	Receptores cannabinoides tipo 1
CB ₂	Receptores cannabinoides tipo 2
CBD	Cannabidiol
CHO-A ₁	Ovario de Hámster Chino-A ₁
CH ₃ COOH	Ácido acético
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria 50
cm ²	Centímetros cuadrados
CMCNa	Carboximetilcelulosa sódica
CO ₂	Dióxido de carbono
COMT	Catecol-O-metiltransferasa
COX2	Ciclooxigenasa 2
DA	Dopamina
DAT	<i>Dopamine transporter</i> – Transportador de dopamina
DDC	Dopadescarboxilasa
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPCPX	8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina
DZP	Diazepam
EA	Enfermedad de Alzheimer
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> - Ácido etilendiaminotetraacético
e.e.m.	Error estándar de la media
EMA	<i>European Medicines Agency</i> - Agencia Europea de Medicamentos
EMEM	<i>Minimum Essential Medium Eagle</i> - Medio mínimo esencial
E-NTPDasa	Ectonucleotidasa
EP	Enfermedad de Parkinson
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno

FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> - Suero fetal bovino
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> - Administración de alimentos y medicamentos
Fe ²⁺	Hierro ²⁺
g	<i>g force</i> - Fuerza g
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GABA-T	GABA transaminasa
GAD	<i>Glutamic acid decarboxylase</i> - Descarboxilasa del ácido glutámico
GAT1	<i>GABA transporter type 1</i>
GBA	Glucocerebrosidasa
GD	Gamma-decanolactona
Glu	Glutamato
GLUT1	<i>Glucose transporter member 1</i> - Transportador de glucosa 1
GPCR	<i>G Protein Coupled Receptors</i> - Receptores acoplados a proteínas G
H	Hidrógeno
h	Hora
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HEK-A _{2B}	Línea Celular Euroscreen de Riñón Embrionario Humano-A _{2B}
Hela-A _{2A}	Línea Celular Epitelial A _{2A} de Adenocarcinoma Cervical Humano
Hepes	Ácido 2-[4-(2-hidroxi-etil) piperazin-1-il] etanosulfónico
HepG2	Línea Celular de Hepatocarcinoma de Humano Caucásico
HVA	<i>Homovanilic acid</i> /Ácido homovanílico
ICBS	Instituto de Ciencias Básicas de la Salud
ICOMT	Inhibidores de la COMT
IDDC	Inhibidores de la DDC
IL	Interleucinas
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
ILAE	<i>International League Against Epilepsy</i> - Liga Internacional Contra la Epilepsia
IMAO	Inhibidores de la MAO

MAO-B	Inhibidor de la MAO-B
INH	Isoniazida - Hidrazida
iNOS	<i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i> - Óxido nítrico sintasa inducible
i.p.	Intraperitoneal
K ⁺	Potasio
kDa	Kilodaltons
kg	Kilogramo
K _i	Constante de inhibición
K _m	Constante de Michaelis-Menten
LABNET	Laboratorio de Neurofarmacología y Toxicología Pre-clínica
L-AAAD	Levo-aminoácido aromático descarboxilasa
LD	Levodopa
LPS	Lipopolisacárido
<i>LRRK2</i>	<i>Leucine-rich repeat kinase 2</i> - Cinasa 2 de repetidos ricos en leucina
μg	Microgramo
μM	Micromolar
MAO	Monoamino oxidasa
MAO-A	Monoaminoxidasa A
MAO-B	Monoaminoxidasa B
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i> - Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MDS	<i>Movementd Disorder Society</i> - Sociedad de trastornos del movimiento
mg	Miligramo
MgCl ₂	Dicloruro de magnesio
mGluRs	<i>Metabotropic glutamate receptors</i> - Receptores metabotrópicos de glutamato
min	Minuto
mL	Mililitro
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium
MV	Volumen molecular
MW	<i>Molecular weight</i> - Peso Molecular

N/n°	Número
NA	Noradrenalina
Na ⁺	Sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NECA	5'-(N-etilcarboxamido) adenosina
NFT	<i>Neurofibrillary tangles</i> - Ovillos neurofibrilares
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
nm	Nanómetro
nmol	Nanomol
nM	Nanomolar
NMDA	N-metil-D-aspartato
nON	Número de aceptores de hidrógeno
nOHNH	Número de dadores de enlaces de hidrógeno
NP-40	Nonidet P40
O ₂	Oxígeno
OFT	<i>Open Field Test</i> - Test de Campo Abierto
p	Nivel de diferencias estadísticamente significativas
pmol	Picomol
pTau	Tau hiperfosforilada
PBS	<i>Saline Phosphate Buffer</i> - Tampón Fosfato Salino
PCT	Picrotoxina
PDE-3	Fosfodiesterasa-3
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i> - Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<i>p</i> -tiramina	4-hidroxi-feniletilamina
PTZ	Pentilentetrazol
p/v	Peso/volumen
rpm	Revoluciones por minuto
R-PIA	(R)-N6-(1-metil-2-feniletil) adenosina
s	Segundos
SAFE	<i>Scientific Animal Food and Engineering</i> - Ingeniería y alimentación animal científica
SAL	Solución salina

SCN1A	<i>Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit 1</i> - Subunidad alfa 1 del canal de sodio regulado por voltaje
SDS-PAGE	<i>Polyacrylamide-sodium dodecyl sulfate</i> - Poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio
SE	<i>Status Epilepticus</i> - Estado epiléptico
s.c.	Subcutánea
SNC	Sistema nervioso central
SNCA	Gen que codifica la proteína α -sinucleína
SNpc	Sustancia negra <i>pars compacta</i>
SSADH	Semialdehído succínico deshidrogenasa
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i> – Tampón Tris salino
TGB	Tiagabina
TH	Tirosina hidroxilasa
THB	Tetrahidrobiopterina
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i> - Factor de necrosis tumoral- α
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i> - Factor de crecimiento transformante beta
TPSA	<i>Topological Polar Surface Area</i> - Área de superficie polar topológica
Tris-HCl	<i>Hydroxymethyl-aminomethane hydrochloride</i> – Tampón tris salino hidrocioruro de hidroximetil-amino-metano
TRPV1	<i>Transient Potential Receiver V1</i> - Receptor de Potencial Transitorio V1
TW	Tween
U	Unidad
<i>UCHL1</i>	<i>Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1</i> - Ubiquitina carboxiterminal hidrolasa L1
UI	Unidad Internacional
V	Voltios
v/v	Volumen/volumen
VGB	Vigabatrina
V _{máx}	Velocidad de reacción máxima
VMAT2	<i>Vesicular Monoamine Transporter 2</i> - Transportador Vesicular de Monoaminas 2

VNS	<i>Vagus Nerve Stimulation</i> - Estimulación del nervio vago
vs.	Versus
ZM 241385	4-(2-[7-amino-2-(2-furyl[1,2,4]-triazolo[2,3-a[1,3,5]triazin-5-yl aminoethyl) phenol
WHO/OMS	<i>World Health Organization</i> - Organización Mundial de la Salud

RESUMEN

1 RESUMEN

1.1 RESUMEN EN CASTELLANO

Las enfermedades neurológicas son actualmente uno de los principales problemas médicos y socioeconómicos, debido a la alta tasa de morbilidad y mortalidad que afectan a cientos de millones de personas en todo el mundo. La epilepsia es un trastorno neurológico crónico, caracterizado por descargas neuronales excesivas y anormales en el cerebro, que conducen a episodios de crisis epilépticas espontáneas y recurrentes. La enfermedad de Parkinson (EP) es considerada una enfermedad neurodegenerativa, crónica y progresiva del sistema nervioso central (SNC) causada por una disminución marcada y gradual en la producción de dopamina (DA) en la vía nigroestriada.

Recientemente se descubrió que las crisis epilépticas están relacionadas con el deterioro cognitivo y que la epilepsia y algunas enfermedades neurodegenerativas, como la EP, tienen etiologías que están intrínsecamente relacionadas. Ambas comparten mecanismos patológicos similares, como la desregulación de neurotransmisores, la excitotoxicidad, la disfunción mitocondrial, el aumento de las citocinas proinflamatorias y de las proteínas pro-apoptóticas, entre otros.

Debido a la compleja etiología de estas enfermedades, hoy se investiga en el desarrollo de nuevos fármacos que sean capaces de actuar sobre múltiples dianas terapéuticas.

La gamma-decanolactona (GD) es un compuesto monoterpénico que en estudios previos demostró tener actividad neuroprotectora *in vivo* e *in vitro*. La presente tesis doctoral tiene como objetivo estudiar los aspectos neurofarmacológicos y el mecanismo de acción de la GD en modelos experimentales de epilepsia y de la EP, para contribuir a un mayor conocimiento de la GD y su posible aplicación en clínica.

En esta tesis se han llevado a cabo estudios *in silico*, *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*.

Los estudios *in silico* incluyen las propiedades fisicoquímicas, la capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) y la capacidad de fijación a las isoformas de la MAO.

Para la realización de los experimentos *in vivo* se utilizaron ratones albinos machos “*Mus Musculus*” CF-1 o Charles River “CD1-Swiss” con 2-3 meses de edad y un peso de 25 ± 5 gramos.

Para evaluar sus propiedades anticonvulsivas, se estudió la posible actuación de la GD (300 mg/kg) en los sistemas purinérgico y GABAérgico, utilizando los modelos de crisis aguda inducida por la aminofilina (AMINOPH) y el de crisis subcrónicas (*Kindling*) inducidas por el pentilentetrazol (PTZ). Para hacer posible esta investigación, utilizamos dos antagonistas de adenosina, el DPCPX (antagonista del receptor A_1) y el ZM241385 (antagonista del receptor A_{2A}) y un antagonista GABAérgico, la bicuculina (antagonista del receptor $GABA_A$). La expresión de proteínas del receptor $GABA_A \alpha_1$ y del receptor de adenosina A_1 se evaluó mediante la técnica de *Western blotting* en muestras de hipocampo de ratones sometidos al modelo de *Kindling*. Además, también se realizaron estudios de unión a los receptores de adenosina A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3 .

Para evaluar sus posibles propiedades antiparkinsonianas, se estudió el efecto de la GD *in vitro* para inhibir las isoformas A y B de la enzima monoamino oxidasa humana (hMAO) y su citotoxicidad en la línea celular de hepatoma humano (HepG2).

Estos estudios *in vitro* se completaron con los ensayos *in vivo*, donde se evaluó la coordinación motora (prueba de *Rota-rod*), la modificación de la temperatura corporal y la actividad locomotora en una prueba de campo abierto. Estos ensayos *in vivo* se realizaron en ratones reserpinizados (1,5 mg/kg, 18:00 h antes) o no reserpinizados, para evaluar el efecto antiparkinsoniano de la GD (300 mg/kg), sola o asociada con levodopa más benserazida (LD+BZ, 100:25 mg/kg).

En los estudios *in silico* los resultados ponen de manifiesto que la GD presenta unas adecuadas propiedades fisicoquímicas, capacidad para cruzar la BHE y para unirse de forma preferente a la isoforma B de la MAO.

Los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad anticonvulsivante muestran que la GD protegió a los ratones contra las crisis agudas inducidas por AMINOPH y contra las crisis subcrónicas inducidas por PTZ. El antagonista del receptor de adenosina A_{2A} (ZM241385) y el antagonista del receptor del $GABA_A$ (bicuculina) no modificaron el comportamiento de la GD. La administración del antagonista del receptor de adenosina A_1 (DPCPX) revirtió el efecto protector de la GD en los dos modelos estudiados. Además, la GD promovió un aumento en la expresión de la subunidad α_1 del receptor $GABA_A$, en el

hipocampo de los ratones sometidos al modelo de *Kindling*. La GD prácticamente no muestra afinidad por los receptores de adenosina.

En los resultados de la evaluación de la GD como antiparkinsoniana se apreció que esta inhibió preferentemente la MAO-B de forma parcialmente reversible, con una CI_{50} $55,95 \pm 9,06 \mu\text{M}$. También es un compuesto seguro, ya que solamente a la concentración más alta (100 μM) disminuyó la viabilidad de las células HepG2.

Finalmente, en los estudios *in vivo*, la GD revertió parcialmente la ataxia de los ratones reserpinizados. El tratamiento concomitante de la GD con la LD+BZ mostró una potenciación de la reversión de la ataxia y también facilitó la reversión de la hipotermia causada por la reserpina para todos los tiempos medidos ($p < 0.01$ vs. vehículo), excepto a las 24:00 h. Por el contrario, la GD no revirtió la hipocinesia en el ensayo de campo abierto.

1.2 ABSTRACT IN ENGLISH

Neurological diseases are currently one of the main medical and socioeconomic problems, due to the high morbidity and mortality rate affecting millions of people worldwide. Epilepsy is a chronic neurological disorder, characterized by excessive and abnormal neural discharges into the brain, leading to spontaneous and recurrent crisis episodes. Parkinson's disease (PD) is considered a neurodegenerative, chronic, and progressive disease of the central nervous system (CNS) caused by a marked and gradual decrease in dopamine (DA) production in the nigrostriatic pathway.

It was recently discovered that epileptic seizures are related to cognitive decline and that epilepsy and some neurodegenerative diseases, such as PD, have intrinsically related aetiologies. Both share similar pathological mechanisms, such as neurotransmitter dysregulation, excitotoxicity, mitochondrial dysfunction, increased pro-inflammatory cytokines and pro-apoptotic proteins, among others.

Due to the complex etiology of these diseases, today research is being carried out on the development of new drugs that are capable of acting on multiple therapeutic targets.

Gamma-decanolactone (GD) is a monoterpene compound that has been shown in previous studies to have neuroprotective activity *in vivo* and *in vitro*. The present doctoral thesis aims to study the neuropharmacological aspects and the mechanism of action of GD in experimental models of epilepsy and PD, to contribute to a greater understanding of GD and its possible clinical application.

In this thesis, *in silico*, *in vitro*, *in vivo* and *ex vivo* studies have been carried out.

In silico studies include physicochemical properties, the ability to cross the blood-brain barrier (BBB), and the ability to bind to MAO isoforms.

Male albino mice "Mus Musculus" CF-1 or Charles River "CD1-Swiss" with 2-3 months of age and weighing 25 ± 5 grams were used to carry out the *in vivo* experiments.

To evaluate its anticonvulsant properties, the possible action of GD (300 mg/kg) in the purinergic and GABAergic systems was studied, using the models of acute seizure induced by aminophylline (AMINOPH) and that of subchronic seizure (Kindling) induced by pentylenetetrazole (PTZ). To make this research possible, we used two adenosine antagonists, DPCPX (A_1 receptor antagonist) and ZM241385 (A_{2A} receptor antagonist) and a GABAergic antagonist, bicuculin ($GABA_A$ receptor antagonist). The expression of proteins of the $GABA_A \alpha 1$ receptor and the adenosine A_1 receptor was evaluated by means of the Western blotting

technique in hippocampal samples of mice subjected to the Kindling model. In addition, studies of binding to adenosine A₁, A_{2A}, A_{2B} and A₃ receptors were also performed.

To evaluate its possible antiparkinsonian properties, the effect of GD *in vitro* to inhibit isoforms A and B of the human monoamine oxidase enzyme (hMAO) and its cytotoxicity in the human hepatoma cell line (HepG2) was studied.

These *in vitro* studies were completed with *in vivo* tests, where motor coordination (Rota-rod test), modification of body temperature and locomotor activity were evaluated in an Open Field Test (OFT). These *in vivo* tests were performed in reserpinized (1.5 mg/kg, 18:00 before) or non-reserpinized mice, to evaluate the antiparkinsonian effect of GD (300 mg/kg), alone or in combination with levodopa plus benserazide (LD+BZ, 100:25 mg/kg).

In the *in silico* studies, the results show that GD has adequate physicochemical properties and the ability to cross BBB.

The results obtained in the evaluation of the anticonvulsant activity show that GD protected the mice against acute seizures induced by AMINOPH and against subchronic seizures induced by PTZ. The adenosine A_{2A} receptor antagonist (ZM241385) and the GABA_A receptor antagonist (bicuculin) did not modify the behavior of GD. Administration of the adenosine A₁ receptor antagonist (DPCPX) reversed the protective effect of GD in the two models studied. Furthermore, GD promoted an increase in the expression of the $\alpha 1$ subunit of the GABA_A receptor in the hippocampus of mice subjected to the Kindling model. GD shows practically no affinity for adenosine receptors.

In the results of the evaluation of GD as antiparkinsonian, it was observed that GD preferentially inhibited MAO-B in a partially reversible way, with an IC₅₀ of $55.95 \pm 9.06 \mu\text{M}$. It is also a safe compound, since only at the highest concentration (100 μM) did the viability of HepG2 cells decrease.

Finally, in the *in vivo* studies, GD partially reversed ataxia in reserpinized mice. Concomitant treatment of GD with LD+BZ showed potentiation of ataxia reversal and also facilitated reversal of hypothermia caused by reserpine for all times measured ($p < 0.01$ vs. vehicle), except at 24:00 h. In contrast, GD did not reverse hypokinesia in the OFT.

1.3 RESUMO EN GALEGO

Esta tese doutoral forma parte dun acordo de colaboración internacional (co-tutela) entre a Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) do Brasil, e a Universidade de Santiago de Compostela (USC) da España.

As enfermidades neurolóxicas son actualmente un dos principais problemas médicos e socioeconómicos por mor da alta taxa de morbilidade e mortalidade que afecta a centos de millóns de persoas en todo o mundo.

Estas enfermidades teñen un grande impacto na vida profesional, social e familiar dos pacientes e poden levar a unha incapacidade total para realizar calquera tipo de actividade diaria. Por este motivo, os cuidadores e familiares que controlan a vida cotiá destes pacientes tamén acaban sendo vítimas invisibles da enfermidade.

A epilepsia é un trastorno neurolóxico crónico, caracterizado por descargas neuronais excesivas e anormais no cerebro, que leva a crises epilépticas recorrentes e espontáneas. Os síntomas dependen da área implicada na orixe e/ou propagación das crises epilépticas. Porén, os máis comúns son: tremores corporais, confusión e dificultade para responder, síntomas visuais ou sensoriais e unha breve perda de coñecemento.

A epilepsia afecta polo menos 50 millóns de persoas en todo o mundo, a maioría nas rexións non atendidas. A incidencia e prevalencia teñen taxas altas en nenos menores de 5 anos, unha baixa incidencia de novos casos na idade adulta e un aumento dos novos casos en adultos maiores de 55 anos.

Segue a ser obxecto de debate como unha lesión cerebral inicial causa crises epilépticas. Non obstante, a excitotoxicidade causada polo glutamato, a neuroinflamación e o estrés oxidativo parecen representar unha "tríade" patóxena que caracteriza a neurobioloxía da epilepsia.

A enfermidade de Parkinson (EP) considérase unha enfermidade neurodexenerativa, crónica e progresiva do sistema nervioso central (SNC) causada por unha diminución marcada e gradual da produción de dopamina (DA) na vía nigrostriatal. Os síntomas da EP adoitan desenvolverse lentamente ao longo dos anos. Os síntomas motores caracterízanse clinicamente como bradiquinesia (lentitude dos movementos), que en estadios avanzados pode alcanzar a akinesia (ausencia de movementos conscientes); rixidez; tremor e reflexos posturais deteriorados, producindo inestabilidade e caídas frecuentes.

A EP considérase o trastorno neurodexenerativo que máis medra no mundo, converténdoo na segunda enfermidade neurodexenerativa máis común, detrás da enfermidade de Alzheimer (EA). De 1990 a 2015, o número de persoas con EP duplicou a máis de 6 millóns, debido principalmente ao envellecemento da poboación e espérase que esta cifra duplique de novo a máis de 12 millóns para o ano 2040.

Un dos trazos característicos da neuroquímica da EP inclúe a perda de neuronas dopaminérxicas no SNpc, que se proxecta cara ao estriado. En estadios avanzados, a dexeneración tamén pode afectar a integridade funcional da corteza prefrontal.

Recentemente descubriuse que as crises epilépticas están relacionadas co declive cognitivo e que a epilepsia e algunhas enfermidades neurodexenerativas, como a EP, teñen etioloxías relacionadas intrinsecamente. Ambos os dous comparten mecanismos patolóxicos semellantes, como a desregulación dos neurotransmisores, a excitotoxicidade, a disfunción mitocondrial, o aumento das citocinas proinflamatorias e as proteínas pro-apoptóticas, entre outras. Son dúas enfermidades neurolóxicas que causan unha discapacidade importante e teñen un impacto negativo substancial na calidade de vida dos pacientes e as súas familias.

A maioría dos fármacos utilizados clinicamente caracterízanse por mellorar os síntomas, pero non afectan a progresión da enfermidade. Este feito, xunto cos efectos adversos, así como o custo/beneficio dos tratamentos estándar para a epilepsia e o Parkinson, aumentaron a demanda de novos medicamentos para tratar estas enfermidades.

Nos últimos anos, o principal obxectivo do enfoque de ambas as enfermidades foi desenvolver medicamentos que permitan non só actuar sobre os síntomas ou atrasar o seu progreso, senón deter ou revertir o proceso fisiopatolóxico que os orixina.

Debido á complexa etioloxía destas enfermidades, hoxe en día estanse a investigar sobre o desenvolvemento de novos fármacos capaces de actuar sobre múltiples obxectivos terapéuticos.

A gamma-decanolactona (GD) é un composto sintético monoterpénico cunha estrutura química semellante ás lactonas presentes no aceite esencial da planta *Aeollanthus suaveolens*, que é usado en etnomedicina polos nativos do Amazonas debido ás súas supostas características medicinais (sedante, anticonvulsiva, analxésica, hipnótica e ansiolítica).

Estudos previos demostraron que a GD presenta actividade hipnótica, hipotérmica e anticonvulsivante en ratos. A GD mostrou un efecto protector significativo nas crises epilépticas inducidas por pentilenetetraol (PTZ), isoniazida (INH) e 4-aminopiridina (4-AP).

Nun modelo agudo de crise inducida por pilocarpina, os ratos que recibiron a dose de 300 mg/kg da GD mostraron unha maior latencia ao comezo da primeira crise. Nas análises bioquímicas, as doses de 300 mg/kg e 100 mg/kg da GD protexeron os animais contra o estrés oxidativo e os danos no ácido desoxirribonucleico (ADN) producidos pola pilocarpina.

Ademais, a avaliación realizada a través dunha proba de *binding* mostrou que a GD foi capaz de inhibir de forma dependente da concentración a unión específica do L- [3H] - glutamato e que esta acción pode estar implicada na actividade anticonvulsivante desta lactona.

Estudos *in vitro* demostraron que a GD atenúa a activación das células microgliais (N9) no modelo de lipopolisacárido (LPS). Simultaneamente, tamén se observou que a GD diminúe a expresión de marcadores inflamatorios como óxido nítrico sintase inducible (iNOS), factor de necrose tumoral- α (TNF- α) e, en consecuencia, inhibe a formación de especies reactivas de osíxeno (EROS). Ademais, a GD bloquea marcadores de apoptose como a fosforilación p38-MAPK e a activación da caspase-9, diminuíndo o dano causado ao ADN. Estes datos indican que a GD ten un potencial terapéutico neuroprotector e que exerce os seus efectos inhibindo a neuroinflamación.

Nun intento por descubrir novas terapias que sexan seguras, efectivas e con poucos ou nulos efectos adversos para o tratamento de enfermidades do SNC, esta tese doutoral tivo como obxectivo xeral profundar no coñecemento dos efectos neurofarmacoloxicos e os mecanismos de acción da GD para avaliar a súa potencial aplicación clínica para o tratamento de dúas enfermidades neurolóxicas prevalentes na poboación actual: a epilepsia e a EP.

Para que isto sexa posible, nesta tese doutoral leváronse a cabo estudos *in silico* (computacional), *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*.

Nos estudos *in silico*, para coñecermos as propiedades fisicoquímicas e farmacocinéticas da GD, realizamos cálculos teóricos utilizando o programa Molinspiration (Molinspiration Cheminformatics, <https://www.molinspiration.com/>).

A predición da capacidade de cruzar a barreira hematoencefálica (BHE) foi avaliada co programa en liña, *CBLigand-BBB* (<https://www.cbligand.org/BBB/>); coa aplicación de dous algoritmos, support vector machine (SVM) e AdaBoos; e con catro tipos de pegadas dixitais, MACCS, Open Babel (FP2), Molprint 2D e PubChem. O programa ofrece unha puntuación predictiva superior a 0 se o composto probado pode atravesar a BHE.

Para avaliar e comprender como a GD se une ás dianas moleculares das dúas isoformas da enzima maomonoaminoxidasa (MAO), realizáronse estudos de *molecular docking*. A estrutura 3D das enzimas MAO-B e MAO-A obtívose a partir do banco de datos de proteínas (*Protein Data Bank* - <https://www.rcsb.org/>). A estrutura 3D do ligando GD obtívose empregando os programas Marvin JS e Open Babel. Os estudos de acoplamento realizáronse empregando o servidor web COACH-D. Despois empregouse o programa Autodock Vina para seleccionar a mellor posición do ligando predefinida.

Para realizar os experimentos *in vivo* empregáronse ratos albinos machos "Mus Musculus" CF-1 ou Charles River "CD1-Swiss" con 2-3 meses de idade e un peso de 25 ± 5 gramos. O número mínimo de animais empregados en cada experimento foi de 8 (N = 8-12).

Antes de realizar os experimentos, os animais aclimatáronse ás condicións ambientais, durante un mínimo de 72 horas, nunha sala cun ciclo de luz/escuridade de 12 horas (luces acesas ás 07:00), cunha temperatura constante de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e con control da humidade ambiental (45 - 65%).

Todos os experimentos realizáronse nunha sala illada á mesma hora do día (entre as 08:00 e as 14:00), para evitar posibles variacións causadas polos ritmos circadianos. Todos os procedementos de manipulación de animais realizáronse mantendo o seu benestar para minimizar o potencial estrés causado polos experimentos.

Para avaliar as súas propiedades anticonvulsivantes, estudouse a posible acción da GD (300 mg/kg) nos sistemas purinérxico e GABAérxico, empregando os modelos de crises agudas inducidas pola aminofilina (AMINOPH) na dose de 280 mg/kg e o modelo de crises subcrónicas (*Kindling*) inducidas polo pentilenotetrazol (PTZ) na dose de 43 mg/kg. Para facer posible esta investigación, empregamos dous antagonistas da adenosina, o DPCPX (antagonista do receptor A_1) (2 mg/kg) e o ZM241385 (antagonista do receptor A_{2A}) (3 mg/kg) e un antagonista GABAérxico, a bicuculina (antagonista do receptor $GABA_A$) (2 mg/kg). O diazepam (DZP) (2 mg/kg), un agonista dos receptores de benzodiazepínicos que mellora a acción do GABA nos receptores $GABA_A$, utilizouse como control positivo neste estudo.

Os parámetros avaliados no modelo agudo de AMINOPH durante sesenta minutos cronometrados foron a aparición de crises tónico-clónicas que duraron máis de 3 segundos e a latencia de aparición da primeira crise.

Por outra banda, os parámetros avaliados no modelo subcrónico de PTZ-*Kindling* durante trinta minutos cronometrados foron a aparición de crises clónicas nas extremidades anteriores, que duraron máis de 3 segundos, e a latencia da primeira crise. Para a comparación entre grupos escolleuse a etapa 3 da escala de Racine para permitir unha avaliación máis clara e precisa do comportamento do animal.

A expresión de proteínas da subunidade $\alpha 1$ do receptor GABA_A e do receptor de adenosina A₁ foron avaliadas mediante a técnica de *Western blotting* en mostras de hipocampo de ratos sometidos ao modelo de *Kindling*. Ademais, tamén se realizaron estudos de unión aos receptores de adenosina A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ a través da proba de *binding*.

Para avaliar as súas posibles propiedades antiparkinsonianas estudouse o efecto da GD *in vitro* sobre a inhibición das isoformas A e B da enzima monoaminoxidasa humana (hMAO). A citotoxicidade de catro concentracións (10 μ M, 25 μ M, 50 μ M e 100 μ M) de GD tamén se avaliou na liña celular de hepatoma humano (HepG2), usando a proba de MTT.

Estes estudos *in vitro* completáronse con probas *in vivo*. Estas probas *in vivo* realizáronse en ratos reserpinizados (1,5 mg/kg, 18:00 h antes) ou non reserpinizados para avaliar o efecto antiparkinsoniano da GD (300 mg/kg), soa ou en combinación con levodopa mais benserazida (LD+BZ, 100:25 mg/kg).

Avaliouse a coordinación motora a través do test de Rota-rod no que os parámetros avaliados foron o tempo empregado na barra xiratoria e a porcentaxe de animais que fallaron (o tempo de corte foi de 180 s). As medidas tomáronse cada 30 minutos durante a primeira hora e media (00:00, 00:30, 01:00, 01:30 h) e finalmente ás 24:00 h da última administración. A modificación da temperatura corporal destes animais tamén foi medida.

No test de actividade locomotora (*Open field test*) avaliáronse os seguintes parámetros durante sesenta minutos: distancia percorrida (cm/h), velocidade media (cm/s) e frecuencia de endereitamento.

Unha condición básica para que calquera composto actúe no SNC é poder atravesar a BHE e entrar no cérebro.

Moitos investigadores traballan coa chamada regra dos 5 ou regra de Lipinski na que se recollen unha serie de propiedades fisicoquímicas comúns a todas aquelas moléculas que teñen boas propiedades de solubilidade e permeabilidade.

Nesta tese, os resultados dos estudos *in silico* mostran que a GD ten valores miLogP compatibles necesarios para atravesar as membranas. Os valores miLogP que oscilan entre -0,4 e +5,6 son aceptables e a GD mostrou un valor neste intervalo (miLogP = 2,12).

O TPSA, descrito como un indicador predictivo da capacidade de atravesar a membrana, é positivo para a GD (TPSA = 26,30). O peso molecular (MW) da GD é 170,25 e o volume molecular (MV) é 180,76. O valor da GD como doadora de enlaces de hidróxeno (nON) foi de 0. Como aceptora de enlaces de hidróxeno (nOHNH) o valor obtido coa GD foi de 2.

A regra de Lipinski predí que a malabsorción ou penetración dun fármaco é máis probable cando hai máis de cinco doadores de enlaces de hidróxeno, máis de 10 aceptores de enlaces de hidróxeno, o peso molecular é maior que 500 Da e o miLogP é maior que 5.

Polo tanto, pódese ver que a GD non incumpre a regra dos 5 de Lipinski, mostrando que presenta propiedades fisicoquímicas axeitadas e capacidade para atravesar a BHE, converténdose nun bo candidato a fármaco.

Os resultados obtidos na avaliación da actividade anticonvulsivante mostran que a GD protexeu os ratos fronte a crises agudas inducidas por AMINOPH. Os animais tratados con GD (300 mg/kg) tiveron un aumento significativo na latencia de inicio da primeira crise ($p \leq 0,05$) e unha diminución da porcentaxe de crises en comparación co grupo control ($p \leq 0,01$), confirmando a súa actividade neste modelo de estudo.

O antagonista do receptor de adenosina A_1 invertiu a protección producida pola GD mentres que o antagonista do receptor de adenosina A_{2A} non puido modificar os efectos da GD. Xuntos, estes resultados mostran que o efecto da GD pode deberse á súa interacción cos receptores de adenosina A_1 , pero non cos receptores de adenosina A_{2A} .

A GD tamén protexeu os ratos contra as crises subcrónicas inducidas por PTZ. Os animais tratados con a GD 300 mg/kg tiveron un aumento significativo da latencia durante a primeira crise ($p \leq 0,001$) e unha diminución da porcentaxe de crises vs. o grupo control ($p \leq 0,001$).

Como vimos no modelo anterior de AMINOPH, estes resultados poden levarnos a pensar que no mecanismo de acción da GD hai unha participación dos receptores de adenosina A_1 , pero non dos receptores de adenosina A_{2A} .

Ademais, a GD promoveu un aumento na expresión da subunidade $\alpha 1$ do receptor $GABA_A$ no hipocampo de ratos sometidos ao modelo de *Kindling*. A GD non presenta practicamente ningunha afinidade polos receptores de adenosina na proba de *binding*.

Nos resultados da avaliación da GD como antiparkinsoniana observouse que a mesma inhibiu preferentemente a MAO-B dun modo parcialmente reversible, cunha CI_{50} de $55,95 \pm 9,06 \mu\text{M}$.

Nesta tese aplicamos a proba de *molecular docking* para comprender as características de unión preferentes do ligando GD á isoforma MAO-B con respecto a MAO-A. En ambas as isoformas, as simulacións de acoplamento revelaron a unión de GD preto do sitio activo da proteína. Estes experimentos revelaron un mellor valor de enerxía libre de unión para o complexo hMAO-B (-7,8 kcal/mol) que para o complexo hMAO-A (-6,1 kcal / mol).

Só a maior concentración da GD (100 μM) diminuíu significativamente a viabilidade das células HepG2 ($p \leq 0,01$), demostrando así que a GD ás concentracións máis baixas (10, 25, 50 y 100 μM) empregadas neste estudo non ten efectos hepatotóxicos. Eses datos son importantes xa que mostran a seguridade da dose de 50 μM da GD, correspondente ao valor da CI_{50} na actividade inhibidora da MAO-B.

Baseado nos resultados anteriores descritos para GD e considerando a súa actividade *in vitro* como inhibidor da isoforma MAO-B, utilizouse a proba de Rota-rod para avaliar o efecto da GD sobre a coordinación motora en animais de experimentación.

Os animais do grupo RES/TW/CMCNa mostraron ataxia en todas as medidas ($p < 0,001$) en comparación co grupo control (animais non reserpinizados), agás ás 24 horas. Houbo unha marcada diminución da coordinación motora á 01:30 h ($57,88 \pm 21,39\text{s}$).

O tratamento con LD+BZ parcialmente reverteu a ataxia despois de 01:00h ($158,70 \pm 14,49\text{s}$, $p \leq 0,001$) e 01:30h ($139,60 \pm 15,96\text{s}$, $p \leq 0,01$) en comparación co grupo RES/TW/CMCNa.

A GD soa reverteu a ataxia despois de 01:00 h e 01:30 h ($128,80 \pm 22,30$, $p \leq 0,05$ e $126,00 \pm 20,18\text{s}$, $p \leq 0,05$); respectivamente, en comparación co grupo RES/ TW/CMCNa.

O tratamento conxunto de GD con LD+BZ, despois de 01:30 h, mostrou unha mellora do efecto protector ($162,90 \pm 12,89\text{s}$, $p \leq 0,001$) en comparación co grupo RES/TW/CMCNa. Este tratamento reverteu máis rápido o estado normal dos animais mostrando que non hai diferenza entre este grupo e o grupo non reserpinizado (grupo control).

A porcentaxe de animais tratados coa GD mais a LD+BZ que fallaron ás 24 h é moi baixa e semellante ao grupo tratado con vehículo, mentres que, ao mesmo tempo da avaliación, os grupos tratados só coa GD ou coa LD+BZ teñen unha porcentaxe de fracaso de arredor do 40%. Estes resultados mostran que hai unha potenciación dos efectos farmacolóxicos coa

asociación de GD máis LD+BZ. Estes resultados de coordinación motora xuntos mostran que hai unha potenciación dos efectos farmacolóxicos coa asociación de GD máis LD+BZ.

A GD non induciu cambios na temperatura corporal en ratos non reserpinizados. Os animais reserpinizados mostraron unha diminución marcada da temperatura corporal en todas as medidas ($p \leq 0,001$), agás ás 24 h, en comparación cos ratos non reserpinizados. A temperatura máis baixa ($32,86 \pm 0,54^{\circ}\text{C}$) alcanzouse, na primeira medición, (00:00) ás 18 h despois da administración de reserpina. Só o tratamento com a GD facilitou a reversión significativa da hipotermia en todo momento medido ($p \leq 0,01$), agás ás 24:00 h, en comparación cos animais reserpinizados. Tras a dose empregada no noso estudo, a LD+BZ soa ou asociada coa GD, non induciu cambios na temperatura corporal dos animais.

A avaliación da actividade locomotora (*Open field test*) nos animais reserpinizados mostrou unha redución significativamente marcada na distancia total percorrida (en cm), na velocidade (cm/s) e no número de endereitamento, en comparación co grupo control tratado co vehículo ($\text{H}_2\text{O} + \text{CH}_3\text{COOH}$) ($p \leq 0,001$). Este descubrimento confirma a hipocinesia debido á diminución da DA na vía nigrostriatal, causada pola reserpina na dose empregada.

O tratamento coa GD soa (300 mg/kg) ou coa LD+BZ sós (100:25 mg/kg) e o co-tratamento con ambos os fármacos asociados non reverteron a hipocinesia causada pola reserpina ($p > 0,05$) nas doses empregadas neste estudo. Ademais, non houbo cambios nos outros parámetros analizados, como a velocidade e o endereitamento.

Nesta tese os principais descubrimentos foron, por un lado, verificar a capacidade da GD de inhibir de xeito selectivo e parcialmente reversible a enzima MAO-B, que, xunto cos resultados obtidos *in vivo*, o fan potencialmente útil para o tratamento da EP. Por outra banda, tamén hai que destacar os efectos anticonvulsivos da GD nos dous modelos animais de crises epilépticas estudadas.

En conclusión, a GD presenta un dobre perfil de posible utilidade clínica, tanto no tratamento da EP como no tratamento da epilepsia.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 INTRODUCCIÓN

Las enfermedades neurológicas son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad y afectan a cientos de millones de personas en todo el mundo, convirtiéndose en uno de los problemas médicos y socioeconómicos más importantes de la actualidad (Abg Abd Wahab *et al.*, 2019; Organización Mundial de la Salud (OMS), 2020).

Estas enfermedades tienen un gran impacto en la vida profesional, social y familiar de los pacientes y pueden llevar a una incapacidad total para realizar cualquier tipo de actividad diaria. Por ello, los cuidadores y familiares que monitorizan la vida diaria de estos pacientes también acaban siendo víctimas invisibles de la enfermedad.

Según la OMS, entre las enfermedades neurológicas se encuentran la epilepsia, la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad de Alzheimer (EA) y otras demencias, la migraña y otras cefalalgias, la esclerosis múltiple, las infecciones neurológicas, los tumores cerebrales, los traumatismos craneoencefálicos, los trastornos neurológicos causados por la desnutrición y otras.

La epilepsia es una enfermedad neurológica crónica, no degenerativa, caracterizada por descargas neuronales excesivas y anormales en el cerebro, que conducen a episodios de crisis espontáneas y recurrentes (Fisher *et al.*, 2014; Fisher *et al.* 2017). Es una de las enfermedades cerebrales graves más comunes y afecta a más de 50 millones de personas, el equivalente a aproximadamente el 1% de la población mundial (OMS, 2020).

Las crisis epilépticas pueden estar asociadas con una variedad de síntomas clínicos, como cambios en la conciencia, movimientos y sensaciones (Chindo *et al.*, 2014). El mecanismo neuronal involucrado en la epilepsia aún no se ha aclarado por completo, pero se sabe que existe un desequilibrio entre los principales sistemas de neurotransmisión excitatorio (glutamatérgico) e inhibitorio (GABAérgico), aumento de la excitotoxicidad y neuroinflamación (Eyo *et al.*, 2016).

Recientemente se descubrió que las crisis epilépticas están relacionadas con el deterioro cognitivo y que la epilepsia y algunas enfermedades neurodegenerativas, como la EP, tienen etiologías que están intrínsecamente relacionadas. Ambas comparten mecanismos patológicos similares, como la desregulación de neurotransmisores, la excitotoxicidad, la disfunción mitocondrial, el aumento de las citocinas proinflamatorias y de las proteínas pro-apoptóticas, entre otros (Devinsky *et al.*, 2013; Abg Abd Wahab *et al.*, 2019). Son dos enfermedades neurológicas que causan una discapacidad significativa y tienen un impacto negativo sustancial en la calidad de vida de los pacientes y sus familiares (OMS, 2020).

La EP es considerada una enfermedad neurodegenerativa, crónica y progresiva del sistema nervioso central (SNC) causada por una disminución marcada y gradual en la producción de dopamina (DA) en la vía nigroestriada, responsable de la aparición de los síntomas (Buhidma *et al.*, 2020). Algunos de los síntomas motores característicos de la EP son: temblores, bradicinesia y rigidez muscular. Pueden existir también alteraciones de la postura, del equilibrio, depresión, ansiedad, trastornos del sueño, entre otros (Brettschneider *et al.*, 2015; Angelopoulou *et al.*, 2020).

La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común, después de la EA, y su prevalencia está claramente relacionada con la edad (Van Den Eeden *et al.*, 2003). Según Ascherio y Schwarzschild (2016), la tasa mediana de incidencia anual estandarizada por edad en países de ingresos altos es de 14 por 100.000 habitantes en la población total, mientras que en sujetos mayores de 65 años la incidencia es de 160 por 100.000 habitantes, datos que crecen cada día principalmente con la mejora de la esperanza de vida.

La EA es la causa más común de demencia, afecta a más de 40 millones de personas en todo el mundo y se caracteriza por la pérdida neuronal observada en regiones responsables de las funciones cognitivas, principalmente en la corteza, en los núcleos basales del prosencéfalo y en el hipocampo.

Al igual que en otras enfermedades neurológicas, la fisiopatología de la EA no está todavía claramente definida. Se sabe que están implicadas diversas alteraciones histopatológicas, como el depósito extracelular del péptido β -amiloide ($A\beta$) en el parénquima cerebral (placas seniles) y en los vasos sanguíneos cerebrales (amiloide vascular), la formación de ovillos neurofibrilares (NFT) de proteína Tau hiperfosforilada

(pTau), pérdida neuronal (principalmente neuronas colinérgicas) y activación e inflamación glial (Selkoe, 2001; Deane *et al.*, 2004; Giacobini y Gold, 2013; Busche y Hyman, 2020).

La búsqueda de nuevas moléculas con propiedades anticonvulsivas incluye el grupo de las lactonas (Coelho De Souza *et al.*, 1997; Rasgado *et al.*, 2017). La α -etil- α -metil- γ -tiobutirilactona, por ejemplo, tiene igual o mejor acción anticonvulsiva que el ácido valproico. Además, es menos tóxica y de acción más prolongada (Ferrendelli *et al.*, 1989).

La gamma-decanolactona (GD) es un compuesto monoterpeneo, estructuralmente similar a las lactonas que se encuentran en el aceite esencial de *Aeollanthus suaveolens*, una especie comúnmente utilizada por la población amazónica como remedio natural (de Oliveira *et al.*, 2008; Pflüger *et al.*, 2018a). La GD en estudios previos demostró tener actividad neuroprotectora *in vivo* e *in vitro* (Coelho De Souza *et al.*, 1997; Pereira *et al.*, 1997; Viana *et al.*, 2007; de Oliveira *et al.*, 2008; Pflüger *et al.*, 2016; Pflüger *et al.*, 2018a, 2018b).

La mayoría de los fármacos utilizados en clínica se caracterizan por mejorar los síntomas, pero no afectan a la progresión de la enfermedad. Este hecho, junto con los efectos adversos, así como el coste/beneficio de los tratamientos estándar de la epilepsia y el Parkinson, han aumentado la demanda de nuevos fármacos para el tratamiento de estas enfermedades.

En los últimos años, el principal objetivo del abordaje de ambas enfermedades ha consistido en desarrollar fármacos que permitan no sólo actuar sobre la sintomatología o únicamente retardar su avance, sino detener o revertir el proceso fisiopatológico que las origina.

2.2. EPILEPSIA

La epilepsia se considera una enfermedad neurológica multifactorial, caracterizada por crisis recurrentes no provocadas. Una crisis epiléptica se define conceptualmente como “una aparición transitoria de signos y/o síntomas debido a una actividad neuronal anormal excesiva o sincrónica en el cerebro”. Esta definición fue publicada en 2005 por la Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE – *International League Against Epilepsy*) (Fisher *et al.*, 2005; Fisher *et al.*, 2014; Fisher *et al.*, 2017). Los síntomas dependen del área involucrada en el origen y/o diseminación de las crisis epilépticas. Sin embargo, los más comunes son: temblores corporales, confusión y dificultad para responder, síntomas visuales o sensoriales y una breve pérdida de conciencia (Johnson, 2019).

De acuerdo con la ILAE, muchos pacientes con una primera crisis aislada nunca vuelven a tener otras crisis. Sin embargo, después de una segunda crisis no provocada, el riesgo de crisis recurrentes es alto, y las personas con dos o más crisis no provocadas separadas por al menos 24 horas son diagnosticadas como epilépticas. De manera similar, las personas con una única crisis, pero con riesgo de futuras crisis de al menos el 60% (según el historial médico o el electroencefalograma) también se consideran epilépticas (Fisher *et al.*, 2014; Fisher *et al.*, 2017; Scheffer *et al.*, 2017; Johnson, 2019).

La epilepsia afecta al menos a 50 millones de personas en todo el mundo, la mayoría en regiones desfavorecidas (OMS, 2020). La incidencia y la prevalencia poseen altas tasas en niños menores de 5 años, una baja incidencia de casos nuevos en la edad adulta temprana y un aumento de casos nuevos en adultos mayores de 55 años.

Las etiologías más comunes de la epilepsia varían a lo largo de la vida. En general las causas de la epilepsia pueden ser estructurales (ACV, tumores cerebrales), genéticas (epilepsias relacionadas con el gen que codifica para la subunidad alfa 1 del canal de sodio regulado por voltaje (SCN1A), infecciosas (infecciones cerebrales bacterianas o virales), metabólicas (síndrome de deficiencia del transportador de glucosa 1 (GLUT1)), inmunitarias (esclerosis múltiple y encefalitis autoinmune) o desconocida. Además, un paciente puede clasificarse en más de una categoría etiológica (Figura 1) (Scheffer *et al.*, 2017, Fisher *et al.*, 2017, Devinsky *et al.*, 2018).

En los niños, la predisposición genética y las malformaciones congénitas o los ACV son las causas más frecuentes. En los adultos jóvenes las lesiones cerebrales traumáticas, las infecciones, las cicatrices y los tumores se convierten en causas importantes. En los adultos de edad avanzada, los ACV, las enfermedades neurodegenerativas y las enfermedades cerebrovasculares son las causas más comunes (Johnson, 2019).

2.2.1 Clasificación de la epilepsia

La clasificación clínica de la epilepsia se basa en las características de las crisis. Hay dos categorías principales divididas en: crisis focales y generalizadas (Figura 1). Las crisis focales comienzan de manera localizada en un área específica del cerebro, y sus manifestaciones clínicas dependen del lugar de inicio, así como de la velocidad de propagación de la descarga epileptógena. Las crisis se dividen en focos simples (sin deterioro de la conciencia) y focos complejos (con al menos un deterioro parcial de la conciencia durante el episodio).

Finalmente, una crisis focal, ya sea simple o compleja, cuando se propaga a toda la corteza cerebral, puede terminar en una crisis tónico-clónica generalizada (TCG), recibiendo una denominación de crisis focal secundariamente generalizada (Elger y Schmidt, 2008; Fisher *et al* 2017; Devinsky *et al*, 2018).

Por otro lado, las crisis generalizadas se caracterizan por crisis cuyo inicio afecta a ambos hemisferios cerebrales simultáneamente. En general, están genéticamente determinadas y acompañadas de cambios de conciencia. Cuando están presentes, las manifestaciones motoras son siempre bilaterales. Como principales ejemplos tenemos las crisis de ausencia, crisis mioclónicas y TCG (Guilhoto, 2011; Fisher *et al.*, 2017).

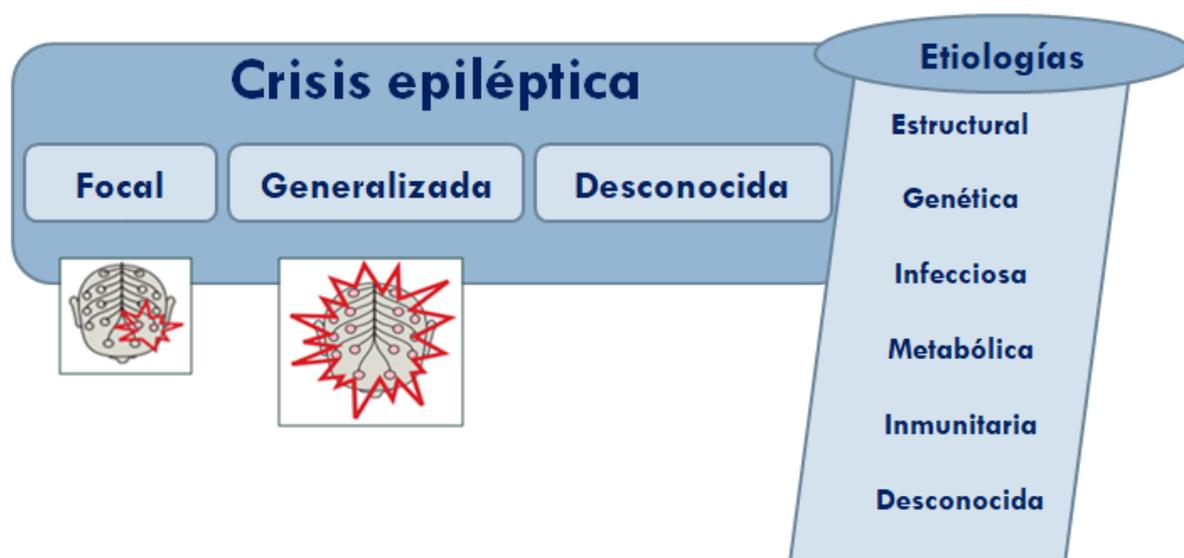


Figura 1: Clasificación de las crisis epilépticas y sus etiologías. Imagen creada por la autora basada en ILAE, 2017. Licencia Creative Commons.

2.2.2 Epileptogénesis

En un contexto mecanicista, la epileptogénesis es un término utilizado para describir un proceso que conduce a la aparición de la primera crisis espontánea y episodios epileptiformes recurrentes después de una agresión cerebral, cambiando de un cerebro normal (no epiléptico) a uno funcionalmente alterado con susceptibilidad a generar crisis espontáneas y recurrentes (Yow *et al.*, 2013; Goldberg y Coulter, 2013; Pitkänen *et al.*, 2015).

La epileptogénesis se puede dividir en tres etapas (Figura 2): (1) evento inicial, (2) período de latencia y (3) período crónico con crisis espontáneas. La epileptogénesis es un proceso lento que transcurre durante varios meses o años hasta que aparezcan las crisis

espontáneas, siendo el período de latencia el tiempo entre la agresión epileptógena y la aparición de la primera crisis clínica (Reddy y Kuruba, 2013; Goldberg y Coulter, 2013).



Figura 2: La base fisiopatológica de la epileptogénesis. Imagen creada por la autora basada en Reddy y Kuruba, (2013). Licencia Creative Commons.

En los seres humanos, los factores desencadenantes de la epileptogénesis, como el ACV, una lesión cerebral traumática, un proceso infeccioso, el uso de algunas sustancias que estimulan el SNC, entre otros, activan eventos de señalización, como inflamación, oxidación, apoptosis, neurogénesis y plasticidad sináptica, que eventualmente conducen a cambios en las neuronas que se manifiestan como hiperexcitabilidad sincronizada anormal y crisis epilépticas espontáneas (Pitkänen *et al.*, 2015; Reddy *et al.*, 2019). El desarrollo posterior de una región del cerebro epileptogénica se puede medir registrando patrones electrofisiológicos específicos como, picos interictales, oscilaciones de alta frecuencia, así como mediante imágenes de resonancia magnética estructural y funcional (Engel y Pitkänen, 2020).

Según Pitkänen y Engel (2014) las investigaciones destinadas a identificar enfoques para prevenir la epilepsia comienzan con estudios para identificar los mecanismos neuronales fundamentales de la epileptogénesis en diferentes tipos de epilepsia, y luego idear intervenciones que aborten o reviertan este proceso, lo que se conoce como antiepileptogénesis. La prevención puede ser completa, es decir, detiene el desarrollo de la epilepsia, o parcial, que retrasa el desarrollo o reduce su gravedad.

La antiepileptogénesis también puede prevenir o reducir la progresión de epilepsia después de que ya se haya establecido. El término *modificación de la enfermedad* se utiliza

para referirse tanto a la antiepileptogénesis como a la modificación de la comorbilidad, es decir, cuando el tratamiento alivia o revierte el desarrollo sintomático o la progresión de las comorbilidades relacionadas con la epilepsia, como ansiedad, depresión, deterioro somatomotor o cognitivo (Engel, 2019).

La epileptogénesis también puede modelarse en roedores y el período de latencia puede oscilar entre días y semanas (Weltha *et al.*, 2019). Los principales modelos en roedores son inducidos por inyecciones de sustancias convulsivantes, como el ácido kaínico y la pilocarpina, que conducen al *status epilepticus* crónico (Goldberg y Coulter, 2013; Pitkänen *et al.*, 2015) y por repetidas inyecciones del convulsivo pentilentetrazol (PTZ) en el modelo de *Kindling* (Bascuñana *et al.*, 2016). La estimulación eléctrica repetitiva de estructuras, como el hipocampo o la amígdala también es considerado un modelo de epileptogénesis (Goldberg y Coulter, 2013; Pitkänen *et al.*, 2015).

2.2.3 Fisiopatología de la epilepsia

La forma en que una lesión cerebral inicial provoca la epilepsia sigue siendo un tema de debate. Sin embargo, la excitotoxicidad causada por el glutamato, la neuroinflamación y el estrés oxidativo parecen representar una “tríada” patógena que caracteriza la neurobiología de la epilepsia (Ambrogini *et al.*, 2019).

Un desequilibrio en el mecanismo excitador e inhibidor del SNC, debido a la pérdida selectiva de neuronas GABAérgicas o excitación intensa por glutamato, provoca descargas eléctricas neuronales excesivas (Figura 3). Por ello, tanto el neurotransmisor glutamato como el ácido gamma-aminobutírico (GABA) tienen un papel crucial en la enfermedad de la epilepsia (Eyo *et al.*, 2016).

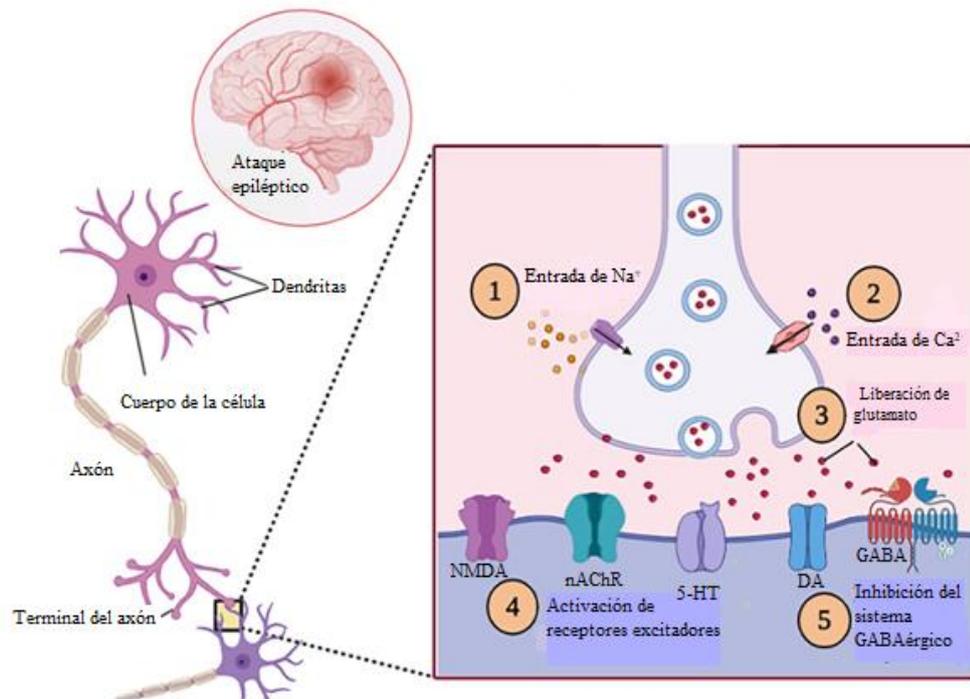


Figura 3: Participación de GABA y glutamato en la epilepsia. nAChR: receptor nicotínico de acetilcolina; 5-HT: receptor de serotonina; DA: receptor de dopamina; GABA_A y B: receptores GABAérgicos. Modificado de Akyuz *et al.*, (2021), con permiso de Elsevier.

La neuroinflamación también está muy involucrada en la fisiopatología de la epilepsia. En realidad, la expresión de mediadores inflamatorios, como la interleucina-1 β (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), está inducida en los astrocitos y en la microglía, lo que origina una cascada de eventos inflamatorios posteriores que da como resultado la alteración de la excitabilidad neuronal aumentando la probabilidad de producción de crisis (Devinsky *et al.*, 2013; Ambrogini *et al.*, 2019). De esta manera no está claro si la neuroinflamación es la causa o consecuencia de la crisis.

El cerebro es un órgano altamente oxidativo debido a su alta producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN) y sus bajos niveles de defensas antioxidantes. El estrés oxidativo resulta en la modulación de las funciones de peroxidación de ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, lo que da como resultado daño celular. Además, la producción de ERO promueve el aumento de las concentraciones de Ca²⁺ citoplásmico, lo cual incrementa la hiperexcitabilidad neuronal. También influye directamente en la acción del receptor GABA_A, altera el potencial de la membrana neuronal y promueve modificaciones de la transcripción genética y síntesis de proteínas, induciendo cambios en las funciones

fisiológicas neuronales. Estos cambios pueden resultar en muerte neuronal por necrosis o apoptosis, siendo uno de los factores más relevantes que pueden conducir al desarrollo de una condición epiléptica (da Fonsêca *et al.*, 2019).

La disfunción mitocondrial, consecuencia del estrés oxidativo, reduce la producción de trifosfato de adenosina (ATP), altera la actividad de la ATPasa Na^+/K^+ responsable de mantener el potencial de la membrana, reduciendo así su actividad y aumentando la excitabilidad neuronal (da Fonsêca *et al.*, 2019).

Recientemente han surgido nuevas perspectivas fisiopatológicas de la epilepsia, implicando el sistema purinérgico en esta patología. Diversos estudios revelan que la adenosina es liberada en gran cantidad durante una crisis epiléptica e interactúa principalmente con receptores de adenosina A_1 presinápticos o postsinápticos, inhibiendo la transmisión sináptica glutamatérgica hipocampal y reduciendo así la excitabilidad (Ribeiro, 2005; Fredholm *et al.*, 2005a; Ilie *et al.*, 2012; Akyuz *et al.*, 2021). Actualmente muchos autores ya han reconocido el papel de la adenosina como anticonvulsivante y neuroprotector endógeno (Roseti *et al.*, 2008; Boison *et al.*, 2010; Weltha *et al.*, 2019; Tescarollo *et al.*, 2020).

2.2.4 Glutamato y GABA

El glutamato (Glu) es el principal neurotransmisor excitador en el SNC y el aminoácido más abundante en el cerebro. Sintetizado por la enzima glutaminasa, en el ciclo glutamina-glutamato de neuronas presinápticas y células gliales (Figura 4). El glutamato participa en funciones cognitivas, incluyendo el aprendizaje, la memoria, la plasticidad sináptica y el desarrollo neuronal. Sin embargo, la sobreestimulación glutamatérgica también está implicada en la excitabilidad neuronal y la neurodegeneración (Ribeiro *et al.*, 2017; Akyuz *et al.*, 2021).

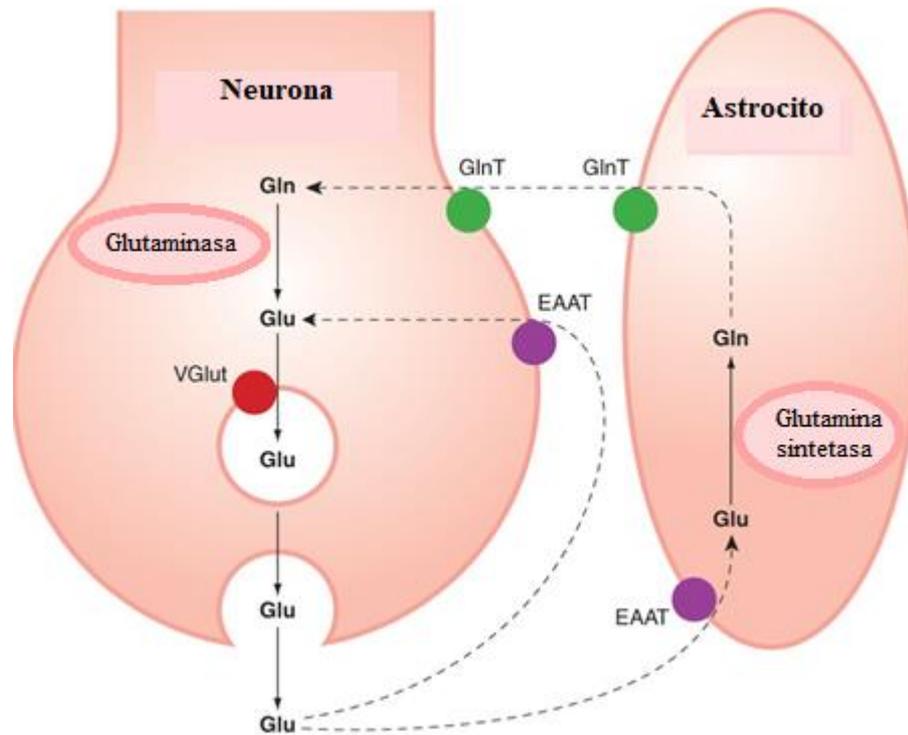


Figura 4: Ciclo glutamina (Gln) y glutamato (Glu) en las neuronas y los astrocitos. EAAT: transportador de aminoácidos excitadores; GlnT: transportador de glutamina; VGlut: transportador vesicular de glutamato. Modificado de Rang y Dale, (2020) con permiso de Elsevier.

Después de la liberación de los terminales nerviosos glutamatérgicos, el glutamato ejerce sus efectos sobre tres subtipos específicos de receptores ionotrópicos en la membrana postsináptica, designados de acuerdo con sus especificidades agonistas: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), kainato y N-metil-D-aspartato (NMDA) (Hollmann and Heinemann, 1994; Rang y Dale, 2020; Sills y Rogawski, 2020). El receptor AMPA posee cuatro subunidades (GluA1-GluA4); el kainato, cinco subunidades (GluK1-GluK5); y el NMDA, siete subunidades (GluN1, GluN2A-GluN2D, GluN3A, GluN3B) (Sills y Rogawski, 2020).

El glutamato liberado sinápticamente también activa los receptores metabotrópicos (mGluRs), que son receptores acoplados a proteína G y tienen la función de controlar la excitabilidad celular y otros procesos celulares a través de la señalización de un segundo mensajero (Sills y Rogawski, 2020). Los subtipos de mGluRs se dividen en tres subgrupos de acuerdo con la homología de secuencia y la activación de la señalización celular. En el grupo I se encuentran el mGluR1 y mGluR5, que se acoplan a Gq/11, promoviendo la liberación de Ca^{2+} de las reservas intracelulares. En el grupo II están el mGluR2 y mGluR3. Finalmente, en

el grupo III están el mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8. Tanto los mGluR del grupo II como del grupo III regulan negativamente la adenilciclase a través de una proteína Gi (Ribeiro *et al.*, 2017).

La sobreestimulación de los receptores de glutamato contribuye a la generación de radicales libres. Estos radicales provocan estrés oxidativo y, en consecuencia, desequilibrio en las funciones mitocondriales. La alteración de la función mitocondrial contribuye a la aparición y progresión de la epilepsia, provocando la activación de las cascadas de apoptosis, el mecanismo básico de la muerte celular. La apoptosis, a su vez, favorece la entrada de iones de Ca^{2+} en las neuronas y la baja regulación de los receptores GABA, lo que conduce nuevamente a la excitabilidad en un proceso de retroalimentación (Pflüger *et al.*, 2018a; Akyuz *et al.*, 2021).

El GABA es el neurotransmisor inhibitor predominante en el SNC de mamíferos que se libera hasta en un 40% de todas las sinapsis en el cerebro. Se sintetiza a partir del glutamato por la acción de la enzima descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) (Figura 5) y, tras la liberación de las terminales nerviosas, actúa sobre los receptores GABA_A y GABA_B (Rang y Dale, 2020; Sills y Rogawski, 2020).

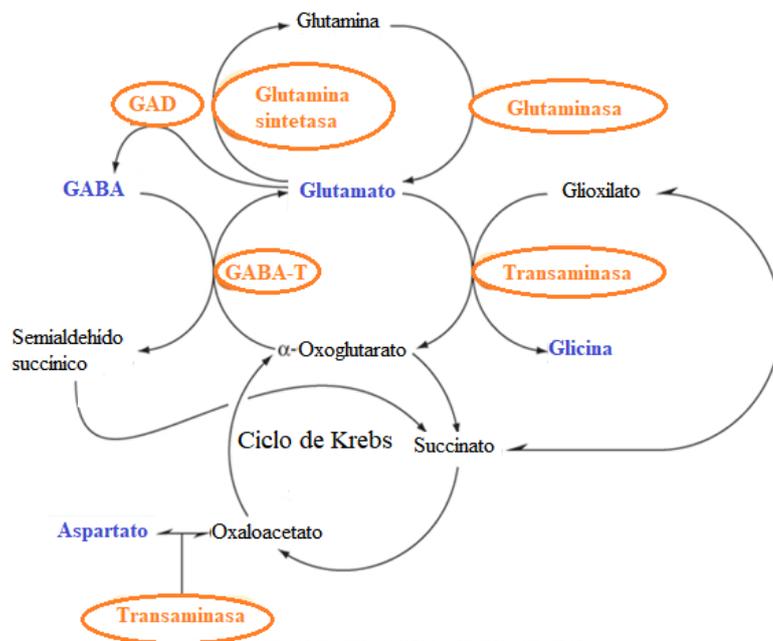


Figura 5: Metabolismo de los aminoácidos transmisores en el encéfalo. GABA-T: GABA transaminasa; GAD: descarboxilasa del ácido glutámico. Modificado de Rang y Dale, (2020) con permiso de Elsevier.

Los receptores GABA_A forman parte de canales iónicos controlados por ligando que ejercen un rápido efecto inhibitor, aumentando el flujo de cloruro hacia el interior de la célula. Hasta el momento se han identificado diecinueve subunidades del receptor GABA_A, dieciséis en el cerebro (α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , θ , π) y tres subunidades adicionales en la retina (ρ 1-3) que se unen como pentámeros heteroméricos para formar canales funcionales (Sills y Rogawski, 2020).

Por el contrario, los receptores GABA_B están acoplados, a través de una proteína G, a los canales de potasio que median la hiperpolarización de la membrana postsináptica y causan un efecto inhibitor lento al disminuir la entrada de calcio (Bowery, 1993; Katzung y Trevor, 2016; Frangaj y Fan, 2018; Rang y Dale, 2020). Este receptor también se expresa en las terminaciones nerviosas presinápticas, donde actúa como autorreceptor, y la activación limita la posterior liberación de GABA.

Una vez que se libera GABA de las terminaciones de los axones presinápticos, la enzima GABA transaminasa (GABA-T) cataliza la conversión del GABA en semialdehído succínico, que posteriormente se convierte en ácido succínico por la enzima succínico semialdehído deshidrogenasa (SSADH) y entra en el ciclo de Krebs. La interrupción de la transmisión GABAérgica se ha asociado con varios tipos de epilepsia (Akyuz *et al.*, 2021).

El pentilentetrazol (PTZ) se utiliza ampliamente para inducir ataques epilépticos en roedores y en el pez cebra (Nieoczym *et al.*, 2019). Actúa uniéndose al sitio de la picrotoxina (PCT) del receptor GABA_A e inhibe el funcionamiento de los canales de cloruro (Akyuz *et al.*, 2021). Algunos estudios han demostrado cambios en la expresión de las subunidades del receptor GABA_A en el hipocampo después de las crisis inducidas por el PTZ (Szyndler *et al.*, 2018; Barzroodi Pour *et al.*, 2019; Pflüger *et al.*, 2020).

El efecto de los fármacos que aumentan la inhibición mediada por GABA se ha estudiado durante mucho tiempo como la principal alternativa para el tratamiento de las crisis epilépticas, incluyendo benzodiazepinas, barbitúricos, vigabatrina (VGB), tiagabina (TGB), muscimol, cetilGABA y progabide, mientras que los antagonistas del GABA, como la bicuculina y la PCT, tienen acción pro-convulsiva (Akyuz *et al.*, 2021).

2.2.5 Adenosina

La adenosina es un nucleósido de purina endógeno producido en las neuronas durante la degradación del ATP extracelular o intracelular y actúa como un neuromodulador de

neurotransmisores como la acetilcolina (ACh), el glutamato, el GABA y la dopamina DA, que están implicados en la modulación de múltiples funciones en el SNC (Soliman *et al.*, 2018; Akyuz *et al.*, 2021). El ciclo de la adenosina incluye su formación a partir de monofosfato de adenosina (AMP) por la acción de la enzima citosólica 5'-nucleotidasa o de la enzima extracelular ecto-5'-nucleotidasas. También puede ser fosforilada a través de la adenosina quinasa (ADK), por lo tanto, los cambios en la expresión y actividad de la ADK afectan el nivel de adenosina extracelular (Cieślak *et al.*, 2017; Akyuz *et al.*, 2021), o aún puede transformarse por la enzima adenosina desaminasa (Figura 6).

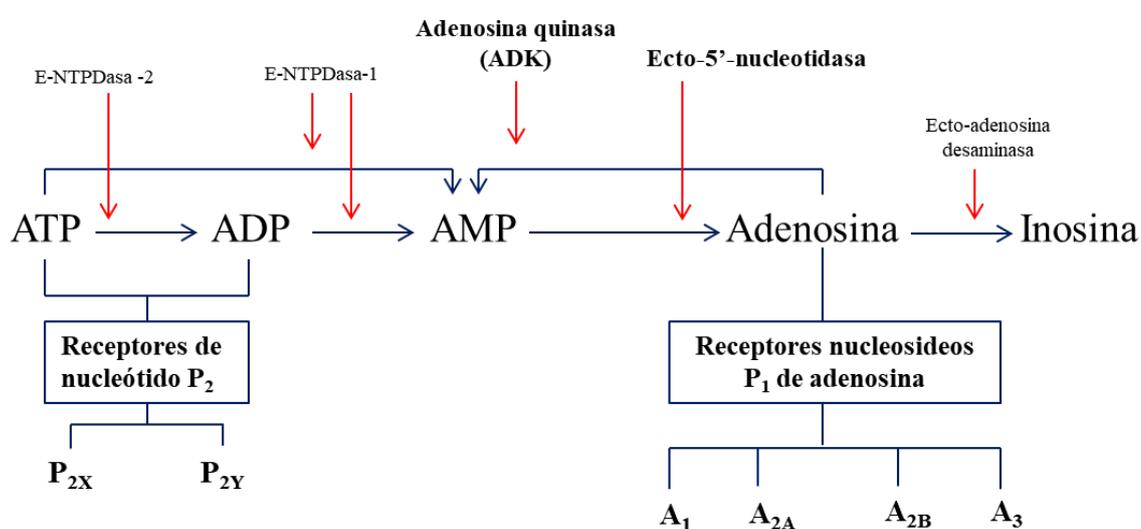


Figura 6: Metabolismo de la adenosina y receptores con los que interacciona. E-NTPDasa: ectonucleotidasa; ADP: adenosina difosfato. Esquema creado por la autora.

Existen dos tipos de receptores purinérgicos (P₁ y P₂). Los receptores nucleosídeos P₁ de adenosina son metabotrópicos, es decir, que cooperan con las proteínas G y se dividen en cuatro subtipos (A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃) (Cieślak *et al.*, 2017; Rang y Dale, 2020).

Los receptores de adenosina A₁ son responsables de la mediación de la inhibición de la actividad neuronal y se expresan en todo el cuerpo, con niveles más elevados en el cerebro, principalmente en la corteza, hipocampo, cerebelo y asta dorsal de la médula espinal. La liberación de neurotransmisores en el hipocampo aumenta en gran medida por el bloqueo farmacológico de los receptores A₁ (Roseti *et al.*, 2008).

Por otro lado, los receptores de adenosina A_{2A} provocan la excitación de las neuronas y se expresan principalmente en el cuerpo estriado. Tanto en el cerebro humano como en el

animal, los receptores A_{2A} se encuentran principalmente en las neuronas postsinápticas del cuerpo estriado; sin embargo, también están presentes significativamente a concentraciones más bajas en los sitios presinápticos en los terminales corticoestriatales y en el hipocampo (Soliman *et al.*, 2018).

Los receptores A_1 y A_{2A} son importantes en diferentes procesos fisiológicos. La reducción en la expresión del receptor A_1 y el aumento en la expresión del receptor A_{2A} afectan a la proliferación de astrocitos y pueden contribuir al desarrollo de gliosis, etapa temprana de la epileptogénesis, que conduce a la aparición de crisis (Masino *et al.*, 2014; Cieślak *et al.*, 2017).

La activación de los receptores A_1 inhibe, mientras que la activación de los receptores A_{2A} estimula la liberación de glutamato y DA (Ferre, 2010; Cieślak *et al.*, 2016). Los efectos conductuales mediados por el receptor A_{2A} y el receptor D_2 de DA tienden a ser opuestos. Por lo tanto, el bloqueo de los receptores D_2 o la interrupción de la transmisión de DA facilita los efectos mediados por la activación del receptor A_{2A} y, a la inversa, el bloqueo de los receptores A_{2A} facilita los efectos mediados por la activación de los receptores D_2 (Salmi *et al.*, 2005; Mori, 2014; Soliman *et al.*, 2018) Figura 7

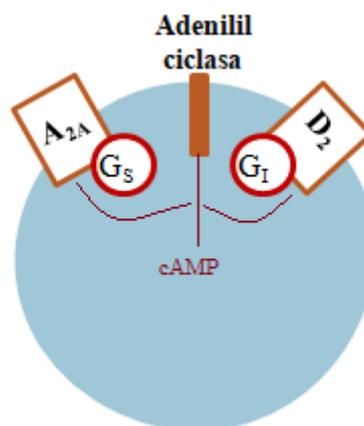


Figura 7: Representación esquemática de la interacción entre los receptores A_{2A} y D_2 en neuronas estriatopaleales. G_s : proteína G estimulante de la adenilil ciclasa; G_i : proteína G inhibidora de la adenilil ciclasa. Imagen creada por la autora basada en Salmi *et al.*, (2005), a partir de imágenes creadas por Servier y disponibles en <https://smart.servier.com/>. Licencia Creative Commons.

Debido a su menor presencia en el cerebro, el papel de los receptores A_{2B} y A_3 ha recibido menos atención y sus efectos son menos conocidos que los de los receptores A_1 y

A_{2A}. Sin embargo, se sabe que los receptores A_{2B} y A₃ presentan una afinidad menor por la adenosina, por lo que el papel de estos receptores cobraría importancia en las situaciones de estrés fisiológico o patológico en las que la concentración de adenosina aumente considerablemente (Burnstock *et al.*, 2011)

El nucleótido ATP actúa a través de receptores del tipo P_{2Y}, acoplados a la proteína G y receptores P_{2X}, que son ionotrópicos, hasta la fecha, en mamíferos se han caracterizado farmacológicamente siete subtipos de receptores P_{2X} (P_{2X1}-P_{2X7}) y ocho subtipos de receptores P_{2Y} (P_{2Y1}, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14) (Jacobson y Müller, 2016; Cieślak *et al.*, 2017). Ambas subclases de receptores se expresan de manera muy abundante en el SNC, donde están presentes tanto en neuronas como en células gliales. El ATP extracelular, mediante la activación de estos dos receptores, actúa como un neurotransmisor excitatorio rápido en diversas áreas del SNC, modulando la excitabilidad neuronal y el funcionamiento de la glía (Jacobson y Müller, 2016).

2.2.6 Papel de los principales neurotransmisores en la epilepsia

Las crisis epilépticas representan el resultado de un desequilibrio en la estimulación eléctrica modulada por neurotransmisores excitadores e inhibidores.

La figura 8, muestra los principales neurotransmisores implicados en la patología de la epilepsia:

En el **cuadro A**, podemos ver el efecto a través de los receptores de glutamato, NMDA, AMPA, kainato y mGlu. Debido al cambio en la actividad de receptores de NMDA y AMPA, el aumento de Ca²⁺, la producción de EROS en la célula y el aumento de la concentración de glutamato se acaba produciendo excitotoxicidad. El estrés oxidativo activa las vías de apoptosis por disfunción mitocondrial.

En el **cuadro B**, el GABA ejerce su efecto inhibitor a través del receptor GABA_A, que facilita la entrada de Cl⁻ en la célula, y los receptores GABA_B que facilitan la salida de K⁺ de la célula. Mecanismos como la extravasación de iones intracelulares y el estrés del retículo endoplásmico se activan como resultado de mutaciones genéticas de las subunidades de los receptores de GABA en la epileptogénesis.

En el **cuadro C**, los receptores nicotínicos de ACh reducen la liberación de citocinas con efectos antiinflamatorios. En este contexto, estos receptores se consideran importantes en la formación de neuroinflamación en la epilepsia. Los receptores muscarínicos de ACh están

involucrados en la producción de EROS junto con los receptores de glutamato. La formación de EROS tiene un efecto sobre el mecanismo de apoptosis y participa en la patogenia de la epilepsia.

En el **cuadro D**, los receptores de adenosina A₁ desempeñan un papel crucial en la modulación de crisis y la neuroprotección, promoviendo la depresión de la transmisión sináptica excitadora y la protección contra los efectos excitotóxicos provocados por la elevada liberación de glutamato durante la crisis epiléptica.

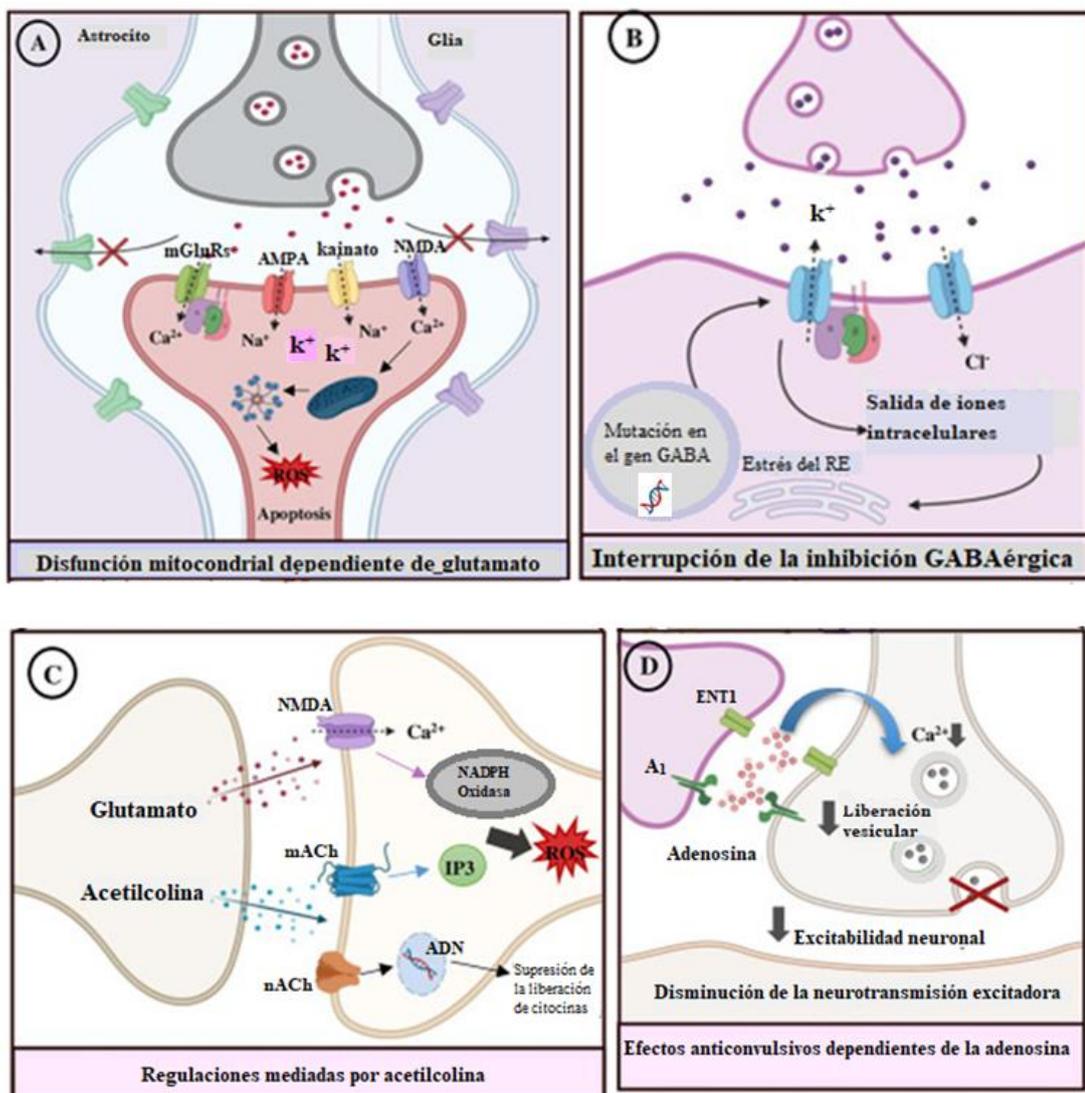


Figura 8: Los principales neurotransmisores implicados en la epilepsia. IP3: trifosfato de inositol; ENT1: transportador de nucleósidos. Modificado de Akyuz *et al.*, (2021) con permiso de Elsevier.

2.2.7 Fármacos antiepilépticos

Los fármacos antiepilépticos además de su utilización en pacientes epilépticos se emplean también para tratar o prevenir las convulsiones causadas por otras enfermedades cerebrales, como traumatismos craneoencefálicos, infecciones, tumores cerebrales, entre otros. Por eso también son conocidos como anticonvulsivos (Katzung y Trevor, 2016; Rang y Dale, 2020).

Actualmente el tratamiento más eficaz para reducir los síntomas de la epilepsia sigue siendo el farmacológico, aunque en algunos casos graves la cirugía también está indicada (Katzung y Trevor, 2016). Sin embargo, en determinadas situaciones se recomienda el uso conjunto de fármacos con otros abordajes terapéuticos, como la estimulación transcraneal de corriente continua (ETCC), estimulación del nervio vago (VNS) y la dieta cetogénica. No obstante, el uso de fármacos continúa siendo indispensable (Frantz *et al.*, 2017; Regner *et al.*, 2018; Ułamek-Koziół *et al.*, 2019).

En aproximadamente dos tercios de los pacientes, las crisis epilépticas se pueden suprimir con la farmacoterapia. Los pacientes deben tomar el fármaco a diario, incluso si la mayoría de los días no tienen crisis. A pesar de la optimización de la terapia farmacológica, alrededor del 10% de los pacientes siguen experimentando crisis a intervalos de un mes o menos, comprometiendo su calidad de vida y actividad laboral (French, 2017; French y Perucca, 2020).

El primer antiepiléptico fue identificado por casualidad, cuando el investigador Charles Locock, en 1857, administró la sal de bromuro de potasio a personas con epilepsia, proporcionando un efecto sedante. Durante mucho tiempo, este fue el único medicamento disponible (Wieser, 1996; Loscher *et al.*, 2013; Rang y Dale, 2020). El fenobarbital fue el segundo compuesto descubierto y pronto se consideró más efectivo que la sal de bromuro. Pasados algunos años, la introducción de modelos animales para el estudio de nuevos compuestos y el comienzo del proyecto de *screening* de nuevos fármacos antiepilépticos condujo a la introducción de la primera, segunda y tercera generación de fármacos antiepilépticos, que proporcionó a médicos y pacientes más opciones para el tratamiento de los diversos tipos de crisis (Figura 9) (Loscher *et al.*, 2013).

Tabla 1. Relación de los principales fármacos utilizados en pacientes con epilepsias sintomáticas, mecanismos de acción, efectos adversos y principales indicaciones.

Fármaco	Mecanismos de acción	Efectos adversos comunes	Principales indicaciones
Fenobarbital^a	Facilita/Provoca la activación de los receptores GABA _A ; disminuye las respuestas excitadoras en las sinapsis	Sedación intensa y depresión	Crisis focales y generalizadas
Valproato de Sodio	Bloquea los canales de Ca ²⁺ activados por bajo voltaje; actúa en los canales de Na ⁺ ; aumenta la síntesis o liberación de GABA; inhibe la GABA-T	Náuseas, pérdida de pelo, aumento de peso, daño hepático, malformaciones fetales, disfunción sexual	Crisis de ausencia, mioclónicas, focales y generalizadas
Carbamazepina	Bloquea los canales de Na ⁺ dependientes del voltaje; mejora la acción de GABA	Sedación, ataxia, visión borrosa, retención de agua, leucopenia y reacciones de hipersensibilidad	Ampliamente eficaz, excepto en crisis de ausencia
Fenitoína^a	Inactiva canales de Na ⁺ dependientes del voltaje; inhibe la liberación de glutamato	Ataxia, vértigo, hipertrofia gingival, hirsutismo, anemia megaloblástica, malformación fetal, reacciones hipersensibles	Crisis focales y generalizadas
Etosuximida	Bloqueo de los canales de Ca ²⁺ activados por bajo voltaje	Náuseas, mareo, cambios de humor, cefalea	Crisis de ausencia
Zonisamida	Bloquea los canales de Na ⁺ dependientes del voltaje	Sedación (discreta), somnolencia, pérdida de peso	Terapia adjunta en las crisis focales y generalizadas
Vigabatrina	Inhibe de manera irreversible la enzima GABA-T; mejora la acción del GABA	Sedación, cambios de comportamiento y estado de ánimo, cambios en la visión	Eficaz para las epilepsias refractarias

		periférica y ocasionalmente psicosis	
Pregabalina	Análogo de GABA/ antagonista de la subunidad $\alpha 2\delta$ -1 de los canales de Ca^{2+}	Sedación, somnolencia, ataxia	Acción poderosa en crisis de inicio focal
Gabapentina	Análogo de GABA/ antagonista de la subunidad $\alpha 2\delta$ -1 de los canales de Ca^{2+}	Sedación, somnolencia, ataxia	Crisis focales
Lamotrigina	Inhibición de la función de los canales de Na^{+} dependientes de voltaje	Mareos, sedación, erupciones en la piel	Crisis focales, generalizadas y de ausencia
Levetiracetam	Unión a la proteína vesicular 2A	Sedación (leve), ansiedad, pérdida de apetito	Crisis focales con o sin generalización, crisis mioclónicas
Tiagabina	Bloquea la recaptación de GABA (inhibe GAT1)	Mareos, somnolencia, náuseas, temblor, trastornos cognitivos	Eficaz en la terapia adyuvante de las crisis focales
Topiramato	Bloquea los receptores glutamatérgicos; mejora el efecto de GABA (sitio de unión distinto de las benzodiazepinas o barbitúricos); bloqueo de canales de Na^{+} dependientes de voltaje	Mareo, sedación, trastornos cognitivos, pérdida de apetito y peso	Terapia adyuvante en crisis focales y generalizadas refractarias
Perampanel	Se une a los receptores AMPA en sitios no competitivos con gran selectividad	Mareo, aumento de peso, sedación, coordinación comprometida, cambios en el estado de ánimo y en el comportamiento	Eficaz en crisis focales y refractarias
Oxcarbazepina	Profármaco - bloquea los canales de Na^{+} dependientes de voltaje	Inestabilidad del estado de ánimo, somnolencia, temblor	Eficaz en las crisis focales

Lacosamida	Inactivación lenta de canales de Na ⁺ dependientes de voltaje	Náuseas, vértigo, alteraciones visuales, alteración de la coordinación, cambios de humor	Terapia adyuvante para crisis focales con o sin generalización
Cannabidiol (CBD)	Modulación de los receptores endocannabinoides, aumento de la actividad del GABA a través de la modulación del receptor GABA _A , agonista del receptor (TRPV1)	Potente interacción con otros antiepilépticos, somnolencia, diarrea	Epilepsias refractarias

^a Efectos adversos importantes, poco utilizado en la actualidad.

Tabla1: Creada por la autora.

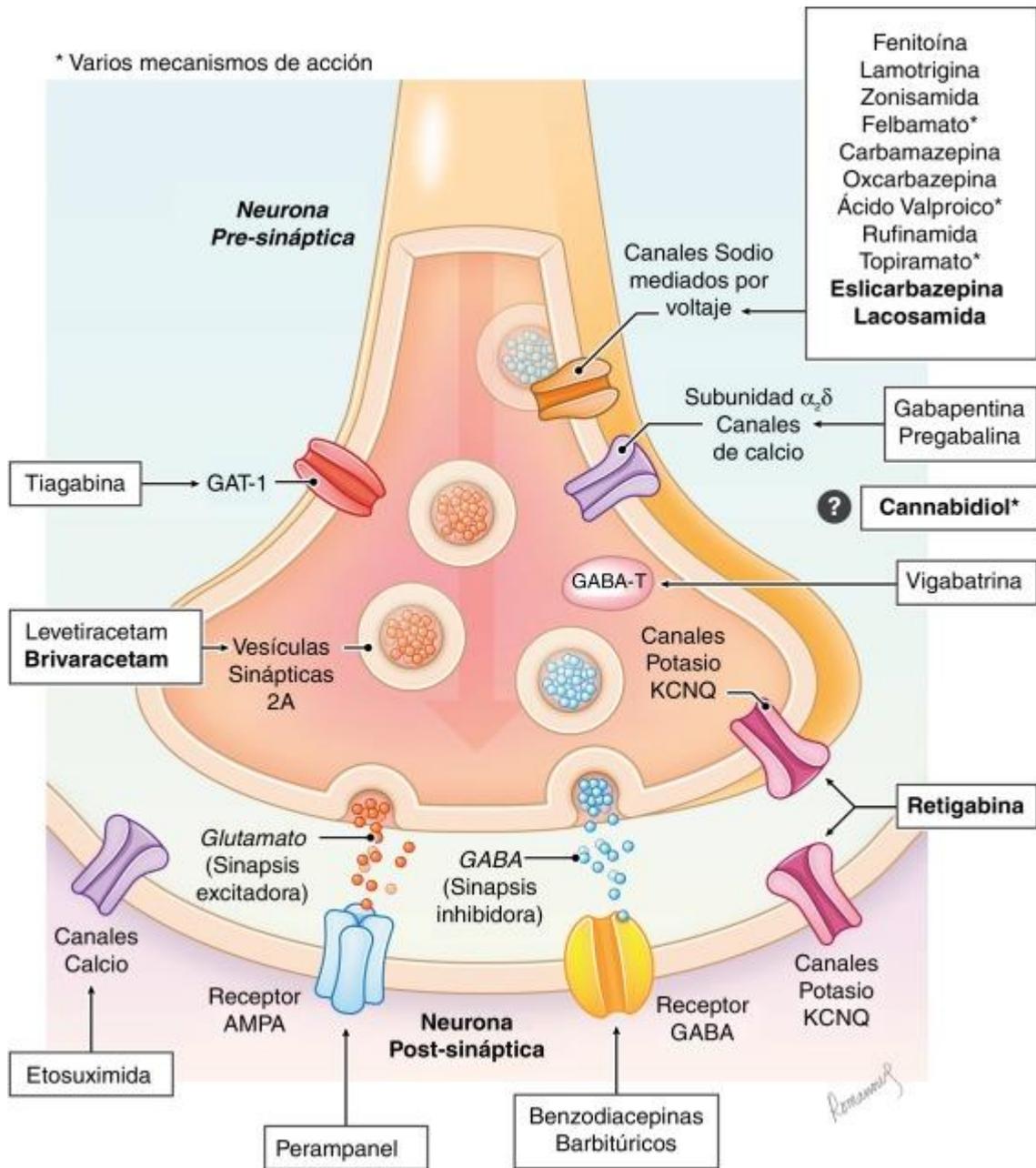


Figura 10. Esquema simplificado del mecanismo de acción de los principales fármacos antiepilépticos en la sinapsis neuronal. Málaga *et al.*, (2019). Licencia Creative Commons.

Recientemente, la FDA (*Food and Drug Administration*) (2018) y la EMA (*European Medicines Agency*) (2019) han agregado la indicación del cannabidiol (CBD) en el tratamiento de crisis epilépticas en pacientes de 2 años o más con síndrome de Dravet o síndrome de Lennox-Gastaut. Aunque también hay evidencia que sugieren que el CBD puede ser eficaz en otras formas de epilepsia y síndromes epilépticos (Devinsky *et al.*, 2016). Su mecanismo de acción en las crisis epilépticas es complejo y no completamente conocido y se

hipotetiza que es debido una interacción con los receptores endocannabinoides que desempeñan un papel en el control de la transmisión sináptica y en el disparo neuronal (Franco y Perucca, 2019). Existen pruebas de que los sistemas endocannabinoides están alterados en varios modelos animales de crisis epilépticas (Ledgerwood *et al.*, 2011; Hofmann y Frazier, 2013; Rosenberg *et al.*, 2017) y también en epilepsias humanas (Ludanyi *et al.*, 2008; Magloczky *et al.*, 2010; Romigi *et al.*, 2010). Por el contrario, se sabe que el CBD tiene una afinidad muy baja por los receptores cannabinoides tipo 1 (CB₁) y tipo 2 (CB₂) (Friedman *et al.*, 2019; Franco y Perucca, 2019), poniendo en duda esa primera hipótesis.

Otros investigadores han hipotetizado que en la acción antiepiléptica del CBD está involucrada un aumento en la actividad del GABA a través de la modulación del receptor GABA_A (Málaga *et al.*, 2019). Además, el CBD, como agonista del receptor de potencial transitorio V1 (TRPV1), desensibiliza este canal, lo que lleva a una disminución de la entrada de Ca²⁺ extracelular y en consecuencia a una reducción de la hiperactividad neuronal (Franco y Perucca, 2019), entre otros mecanismos de acción. En resumen, los datos disponibles indican que el CBD actúa en múltiples dianas terapéuticas. Su principal ventaja es que se ha probado su eficacia en dos de los síndromes epilépticos mencionados anteriormente, que son difíciles de controlar (Málaga *et al.*, 2019; Cristino *et al.*, 2020).

Los antiepilépticos actuales disponibles en clínica controlan eficazmente las crisis en el 70% de los pacientes, siendo un 30% de los pacientes refractarios a esos tratamientos. Además, los fármacos existentes tienen una gran cantidad de efectos secundarios, interacciones farmacocinéticas, baja tolerabilidad y seguridad y altos costes, lo que limita a menudo sus usos (Katzung y Trevor, 2016; Brodie *et al.*, 2016; Rang y Dale, 2020).

Todos estos hechos ponen de manifiesto la necesidad de una mejor comprensión de los mecanismos básicos de la epilepsia y la búsqueda y posterior desarrollo de nuevas terapias farmacológicas más eficaces y con menos efectos adversos.

2.2.8 Modelos experimentales de epilepsia

Se han desarrollado una variedad de modelos animales para estudiar y comprender la neurobiología de las crisis o *status epilepticus* (SE). Cada modelo animal puede poner de manifiesto diferentes tipos de crisis epilépticas, es decir, cada modelo es único y está más cerca de un cierto tipo de epilepsia humana (Yow *et al.*, 2013). Podemos citar como ejemplo

algunos modelos experimentales de epilepsia: modelos químicos, eléctricos, térmicos y modelos *in vitro*.

El modelo químico implica la administración de una sustancia que tiene una acción inductora de la crisis. Este método es fácil de realizar, comparado, por ejemplo, con un modelo eléctrico, en el que es necesaria la implantación de electrodos (Reddy y Kuruba, 2013). Diferentes sustancias tienen comprobada capacidad para inducir crisis o estado epiléptico en roedores, lo que las convierte en herramientas útiles para la generación de modelos bien establecidos de crisis epilépticas. Los dos modelos utilizados en este estudio han sido:

1) **Modelo de aminofilina (AMINOPH):** las propiedades convulsivas del compuesto químico AMINOPH (teofilina-2-etilendiamina) aún no se conocen totalmente. A pesar de ello, hasta ahora se sabe que su acción estimulante en el SNC es principalmente debida a su componente teofilina. Esta, por un lado, bloquea los receptores de adenosina A₁, y por otro, inhibe la enzima fosfodiesterasa-3 (PDE3), lo que provoca un aumento de la excitabilidad neuronal y consecuentemente la generación de crisis epilépticas (Chu, 1981; Butler *et al.*, 1995; Gulati, 2005; Ochi, 2011; Ya'u *et al.*, 2015; Staley, 2015; Rang y Dale, 2020). AMINOPH se puede administrar de forma crónica con una subdosis o de forma aguda con una dosis más alta. En esta tesis se ha utilizado de forma aguda. Las crisis generadas son clasificadas como tónico-clónicas (Jaishree *et al.*, 2003; Ya'u *et al.*, 2015).

2) **Modelo de *Kindling*:** consiste en la administración repetida e intermitente de estímulos químicos o eléctricos que conducen al desarrollo progresivo de las crisis epilépticas focales, culminando en una actividad de crisis secundariamente generalizadas (McNamara, 1984; Cheng *et al.*, 2020). En estas tesis se ha utilizado el PTZ de forma subcrónica.

Según Goddard, (1969), el primer investigador en describir el *Kindling*, el estímulo inicial de crisis (estímulo que no produce ningún signo conductual o electroencefalográfico), cuando se aplica repetidamente a ratas, induciría crisis generalizadas. El principio clásico: “Las crisis generan crisis”, describe con precisión el principio subyacente y el resultado del modelo de *Kindling* (Ben-Ari, 2006). Entre los protocolos de *Kindling* se destaca el inducido por una subdosis del compuesto

químico PTZ, que bloquea los canales de cloro en los que se encuentran los receptores GABA_A, induciendo crisis clónicas (Reddy y Kuruba, 2013). Una vez que se han desarrollado las crisis los cambios que se producen suelen persistir durante meses o años, por lo que es uno de los modelos animales de epileptogénesis más aceptado en la búsqueda de nuevos fármacos anticonvulsivos (Bascuñana *et al.*, 2016).

2.3 ENFERMEDAD DE PARKINSON

En el año de 1817 el médico británico James Parkinson escribió el ensayo *Paralysis Agitans*, donde detalló varios síntomas típicos de la enfermedad que hoy en día lleva su nombre, incluyendo el temblor en reposo, la rigidez muscular y los cambios posturales (Parkinson, 2002; Dorsey *et al.*, 2018). Sin embargo, la EP ya era conocida en tiempos clásicos. Hay referencias de la enfermedad en la Biblia, en textos hindúes y egipcios (García-Ruiz, 2004).

La EP es considerada el trastorno neurodegenerativo de más rápido crecimiento en el mundo, convirtiéndose en la segunda enfermedad neurodegenerativa más común, por detrás de la EA (Van Den Eeden *et al.*, 2003). De 1990 a 2015, la cantidad de personas con la EP se duplicó a más de 6 millones, esto es debido principalmente al envejecimiento de la población y se prevé que este número se duplique nuevamente a más de 12 millones para el año de 2040 (Dorsey *et al.*, 2018).

El aumento de la esperanza de vida en los países desarrollados hace que la población mayor sea más susceptible a desarrollar enfermedades neurológicas como la EP, especialmente los hombres (Ascherio y Schwarzschild, 2016; Benito-Leon, 2018; Vaidya *et al.*, 2021). La prevalencia e incidencia de la EP varían mucho en todo el mundo. En general, la prevalencia es más alta en Europa y Estados Unidos que en otros países. En los países de Asia, América Latina y África es menor, especialmente en este último continente (Von Campenhausene *et al.*, 2005; Bauso, 2015; Benito-Leon, 2018).

Los comportamientos sociales, políticos y económicos están impulsando el aumento de muchas enfermedades no transmisibles. Algunos de los *vectores de enfermedades* incluyen alimentos y bebidas ultraprocesados, alcohol, cambios sociales y ambientales que limitan la actividad física y los subproductos de la industrialización, incluyendo pesticidas, solventes y metales pesados (Dorsey *et al.*, 2018).

Generalmente los síntomas de la EP se desarrollan lentamente a lo largo de los años. A menudo la evolución varía de un paciente a otro. Los síntomas motores se caracterizan

clínicamente como bradicinesia (lentitud de movimientos), que en fases avanzadas puede llegar a la acinesia (ausencia de movimientos conscientes); rigidez; temblor y alteración de los reflejos posturales, cuya consecuencia son la inestabilidad y las caídas frecuentes (Brettschneider *et al.*, 2015; Kalia y Lang, 2015; Poewe *et al.*, 2017; Angelopoulou *et al.*, 2020).

Además de los síntomas relacionados con el movimiento, existen otros síntomas llamados no motores, que aparecen durante el desarrollo de la enfermedad y contribuyen a deteriorar la calidad de vida del paciente. Entre ellos destacan las alteraciones cognitivas (demencia, pérdida de memoria), de la percepción (alucinaciones, delirio, falsas percepciones), de la emotividad (depresión), gastrointestinales (estreñimiento, sialorrea, disfagia), de los patrones del sueño y la presencia de fatiga y dolor muscular (Figura 11) (Cacabelos, 2017; Poewe *et al.*, 2017; Angelopoulou *et al.*, 2020; Buhidma *et al.*, 2020).

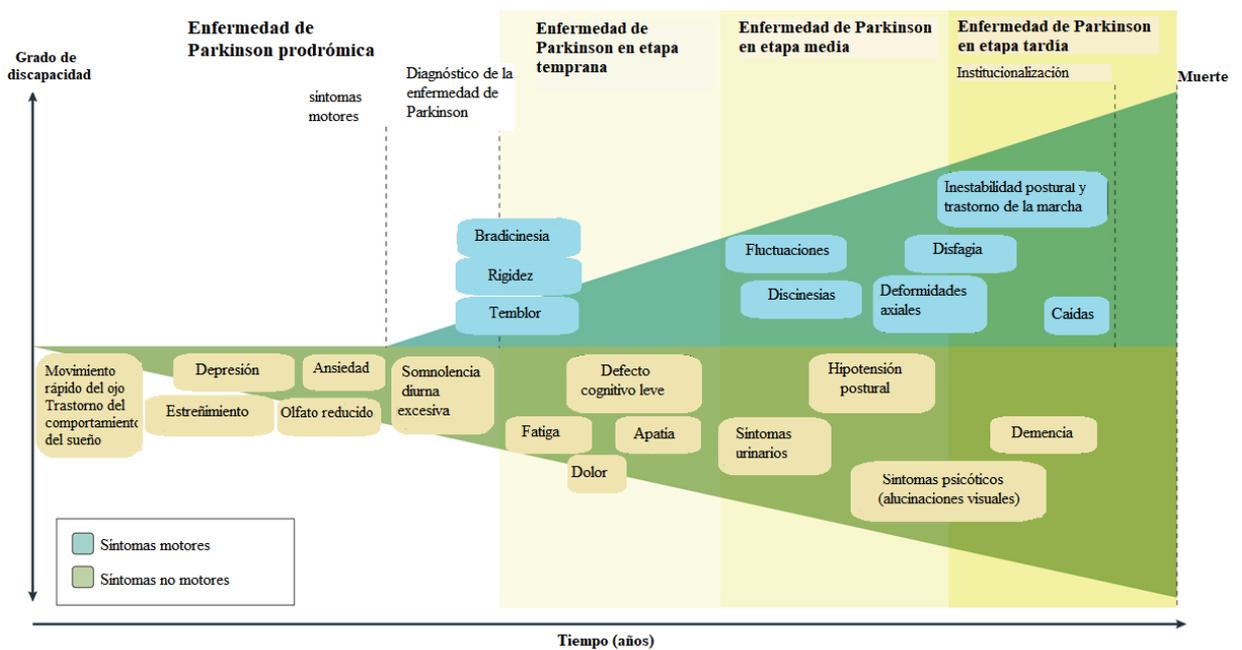


Figura 11: Síntomas clínicos asociados con la progresión de la enfermedad de Parkinson. Modificada de Poewe *et al.*, (2017). Licencia Creative Commons.

Desafortunadamente, aún no se dispone de una prueba o marcador de diagnóstico confiable y fácilmente aplicable para diagnosticar la EP. Por lo tanto, el diagnóstico de la EP en estudios epidemiológicos se basa en los síntomas clínicos (Kalia y Lang, 2015). La *Movement Disorder Society* (MDS) creó criterios para facilitar el diagnóstico, que constan de

cuatro pasos que deben ser evaluados por el médico, como se muestra en la figura 12 (Reich y Savitt, 2019).

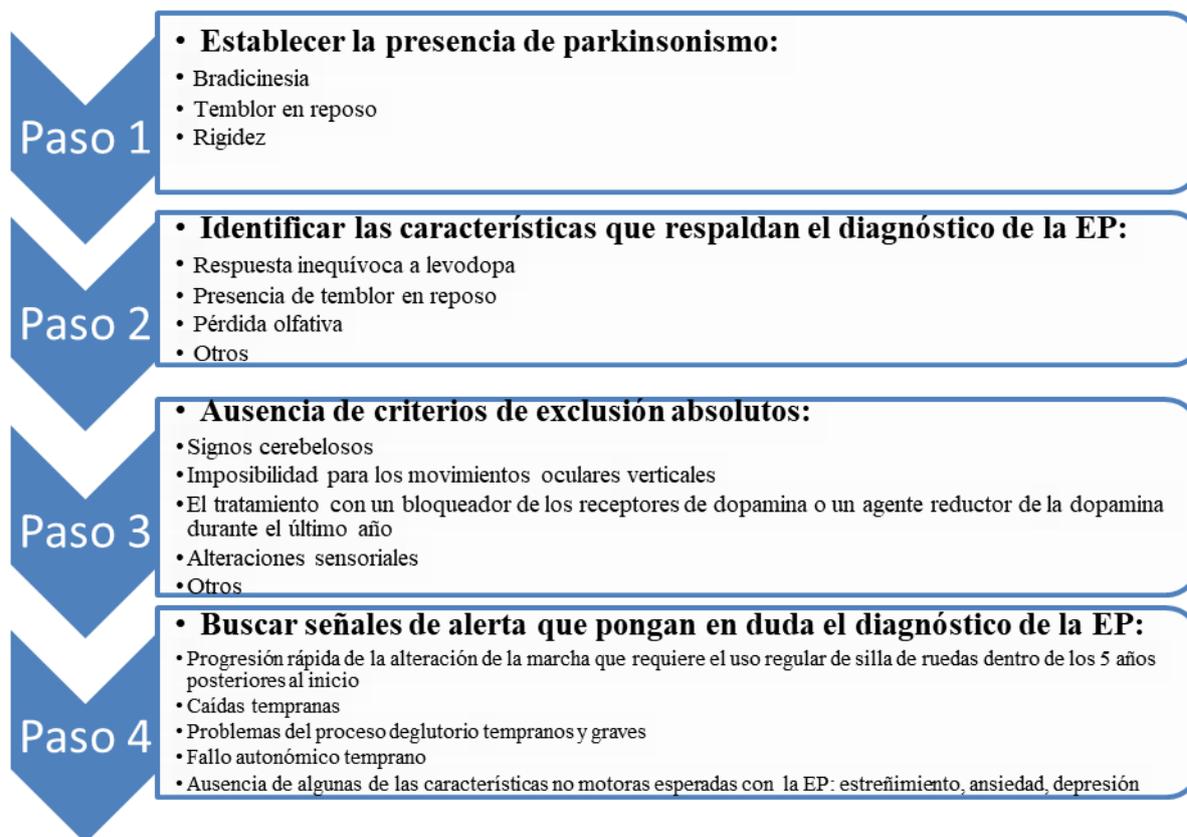


Figura 12: Enfoque de cuatro pasos para el diagnóstico de la EP. Esquema creado por la autora.

Hasta la actualidad, la confirmación del diagnóstico de los síntomas clínicos se realiza *post mortem* mediante autopsia, observándose la degeneración de las neuronas de la sustancia negra *pars compacta* (SNpc) y la presencia de cuerpos de Lewy (Kalia y Lang, 2015).

Un sesgo en el diagnóstico de EP es el parkinsonismo atípico, que incluye enfermedades neurodegenerativas como la parálisis supranuclear progresiva, la demencia difusa con cuerpos de Lewy, la degeneración del ganglio corticobasal y la atrofia multisistémica. Dichas enfermedades tienen síntomas muy similares a la EP. En estos casos para diferenciar la EP del parkinsonismo atípico o secundario, los médicos observan si hay una mejoría clínica drástica con la LD, lo que sugiere ser de hecho la EP (Foubert-Samier *et al.*, 2012; Reich y Savitt, 2019).

El riesgo de desarrollar la EP es claramente multifactorial. Según Kalia y Lang, (2015), la edad es uno de los mayores factores de riesgo, en virtud de que la mayoría de los pacientes

tienen más de 60 años. De acuerdo con datos epidemiológicos y bioquímicos se cree que tanto el entorno como la genética afectan al riesgo y la progresión de la enfermedad (de Lau y Breteler, 2016; Blauwendraat *et al.*, 2020).

Se han encontrado asociaciones potenciales entre la EP y varios factores ambientales, incluida la exposición directa o indirecta a pesticidas como el 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), herbicidas como el paraquat, plaguicidas, metales pesados, disolventes orgánicos e ingesta de agua contaminada del pozo (Ascherio y Schwarzschild, 2016; Bellou *et al.*, 2016; de Lau y Breteler, 2016). El uso de fármacos con efectos adversos del tipo parkinsoniano, como los antipsicóticos típicos o la deficiencia de algunas vitaminas, también son factores de riesgo de la EP (Bellou *et al.*, 2016; Blauwendraat *et al.*, 2020).

Desde el punto de vista genético el primer gen asociado con la EP hereditaria fue el SNCA (1997), que codifica la proteína α -sinucleína, formando acúmulos de proteína anormal conocidos como cuerpos de Lewy. Mutaciones en el gen *LRRK2*, *UCHL1*, *VPS35*, *RIC3*, entre otros, provocan parkinsonismo autosómico dominante (Kalia y Lang, 2015; Katzung y Trevor, 2016; Puschmann, 2017).

De la misma manera que las mutaciones en el gen *PRKN*, *SYNJ1*, *PINK1*, *DJ-1* causan parkinsonismo autosómico recesivo, muchos otros genes o regiones cromosómicas se han asociado con la EP (de Lau y Breteler, 2016; Katzung y Trevor, 2016; Puschmann, 2017; Blauwendraat *et al.*, 2020).

El género también puede ser un factor de riesgo. Se ha establecido la relación de aproximadamente 3 hombres con la EP por cada 2,28 mujeres, por lo que el género masculino presentaría un condicionante de mayor riesgo que el femenino (Kalia y Lang, 2015; Blauwendraat *et al.*, 2020).

2.3.1 Fisiopatología de la enfermedad de Parkinson

El origen neuroquímico de la EP fue dilucidado en 1960 por Hornykiewicz, quien demostró que uno de los rasgos característicos de esta enfermedad incluye la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SNpc, que proyectan al estriado (Fahn, 2015; Raza *et al.*, 2019). En estados avanzados, la degeneración también puede afectar a la integridad funcional de la corteza pre-frontal (Poewe *et al.*, 2017; Raza *et al.*, 2019).

La dramática pérdida de estas neuronas dopaminérgicas de la SNpc, incluso en las primeras etapas de la enfermedad, sugiere que la degeneración en esta región comienza antes

del inicio de los síntomas motores, lo que está respaldado por un estudio clínico-patológico reciente (Poewe *et al.*, 2017).

Los aspectos fisiológicos del envejecimiento y la fisiopatología de la EP están intrínsecamente relacionados, una vez que en los dos procesos hay una reducción de las concentraciones de DA en el estriado, debido a la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas de la SNpc y la aparición de cuerpos de Lewy. Sin embargo, en los pacientes afectados por la EP, la pérdida es más rápida y precoz, reduciendo la actividad de las áreas motoras de la corteza cerebral, desencadenando la reducción de los movimientos voluntarios.

Aunque ya ha sido ampliamente estudiada, la causa de la pérdida neuronal en la EP y el papel de estas inclusiones de proteínas no se comprenden completamente. Sin embargo, se han identificado varios cambios moleculares y celulares que podrían estar involucrados en la degeneración neuronal, incluida la homeostasia irregular del Ca^{2+} , la disfunción proteica, la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, la excitotoxicidad, la neuroinflamación y los procesos apoptóticos. Todos estos procesos originan la activación microglial que contribuye al deterioro y la progresión de la enfermedad (Figura 13) (Samii *et al.*, 2004; Hirsch y Hunot, 2009; Poewe *et al.*, 2017; Raza *et al.*, 2019).

Cabe destacar que esta cascada de eventos está involucrada en varias enfermedades neurodegenerativas, por lo que no es un mecanismo exclusivo de la EP (Hirsch y Hunot, 2009). Por lo tanto, la búsqueda de un mayor conocimiento sobre los mecanismos específicos implicados en la fisiopatología de la EP se vuelve imprescindible.

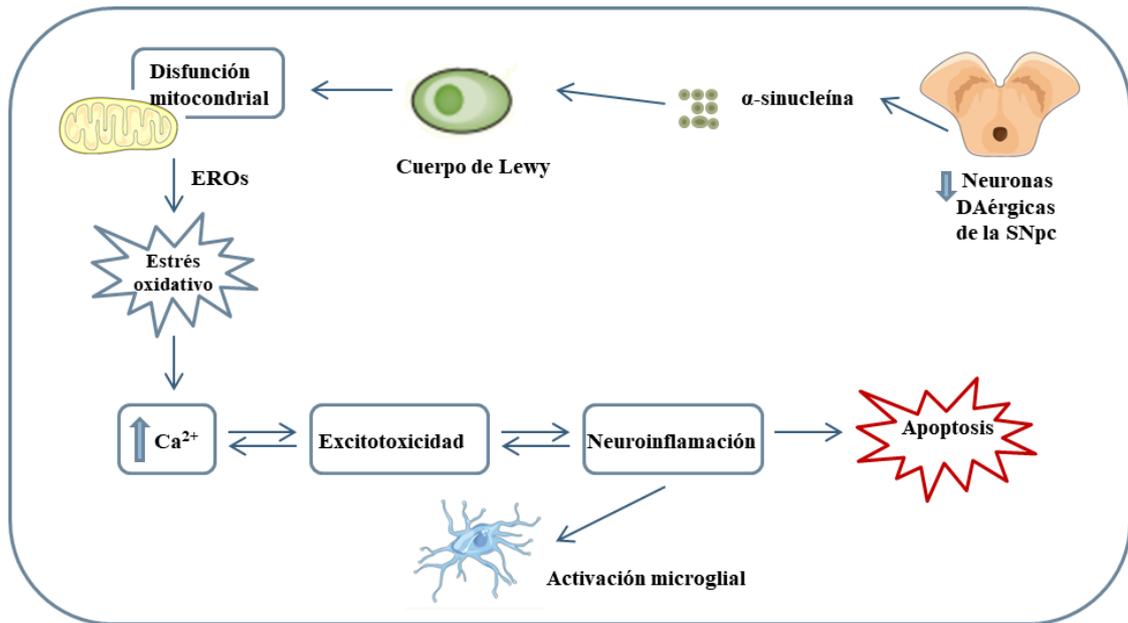


Figura 13: Mecanismos moleculares implicados en la EP. Imagen creada por la autora basada en Poewe *et al.*, (2017), a partir de imágenes creadas por Servier y disponibles en www.smart.servier.com. Licencia Creative Commons.

2.3.2 Dopamina y receptores dopaminérgicos

Entre las monoaminas, las catecolaminas derivan del aminoácido tirosina e incluyen tres neurotransmisores esenciales: la DA, la noradrenalina (NA) y la adrenalina (A). La noradrenalina generalmente regula los patrones del sueño, la concentración y el estado de alerta, mientras que la adrenalina, además de regular el sueño, regula también el estado de alerta y la respuesta de lucha o huida (Klein *et al.*, 2019). Como principal neurotransmisor catecolaminérgico y predominante en el cerebro de los mamíferos, la DA controla una variedad de funciones que incluyen la actividad motora y locomotora, la cognición, el refuerzo positivo, la ingesta de alimentos, la regulación endocrina, la función de memoria espacial y la excitación (Beaulieu y Gainetdinov, 2011).

La mayor parte de la síntesis de DA se produce a partir del aminoácido tirosina proveniente de la dieta. La DA también puede sintetizarse a partir del aminoácido fenilalanina, una vez que la fenilalanina se convierte en tirosina mediante la actuación de la enzima fenilalanina hidroxilasa (Klein *et al.*, 2019). Independientemente del origen de la tirosina, la ruta metabólica primaria implica una síntesis de dos pasos en el citosol. La tirosina hidroxilasa (TH), enzima que limita la velocidad, convierte la tirosina en levodopa (LD), utilizando tetrahidrobiopterina (THB), oxígeno (O_2) y hierro (Fe^{2+}) como cofactores (Rang y Dale, 2020).

Posteriormente, la levodopa (LD) es descarboxilada por la enzima levo-aminoácido aromático descarboxilasa (L-AAD) o dopadescarboxilasa (DDC) para obtener DA. Igual que en la etapa anterior la reacción ocurre en el citoplasma, pero en este caso la enzima se encuentra en muchas células del organismo, no es específica y como cofactor necesita la presencia de la vitamina B₆.

El almacenamiento de la DA se realiza en las vesículas a través del transportador vesicular de monoaminas (VMAT) para evitar la acción de las enzimas degradantes. Las vesículas en su interior tienen un pH ácido por la presencia de una bomba de protones, lo que hace que la DA se mantenga en su forma ionizada y no difunda hacia el exterior de la membrana. El transportador VMAT también está presente en vesículas de otras terminaciones como las noradrenérgicas y las serotoninérgicas (García-Sevilla y Meana, 2008; Mulvihill *et al.*, 2019; Rang y Dale, 2020).

Se han identificado dos isoformas de VMAT: el tipo 1 (VMAT1) y el tipo 2 (VMAT2). El VMAT2 se expresa principalmente en neuronas monoaminérgicas del SNC y se encarga de secuestrar la DA citosólica y llevarla al interior de las vesículas sinápticas. Sin embargo, el VMAT1 se encuentra de forma predominante en células endocrinas/paracrinas asociadas con el estómago, el intestino y el sistema nervioso simpático (Mulvihill *et al.*, 2019).

Tras su liberación de las terminaciones nerviosas, la DA interactúa con los receptores dopaminérgicos y una gran parte vuelve a ser captada por medio de un transportador específico, el DAT (*Dopamine transporter*), que es fundamental en la regulación extra e intracelular de DA (Rang y Dale, 2020). El proceso de recaptación de DA es importante porque permite su reutilización, una menor dependencia de la síntesis de la misma y una liberación neuronal prolongada (Mulvihill *et al.*, 2019) (Figura 14).

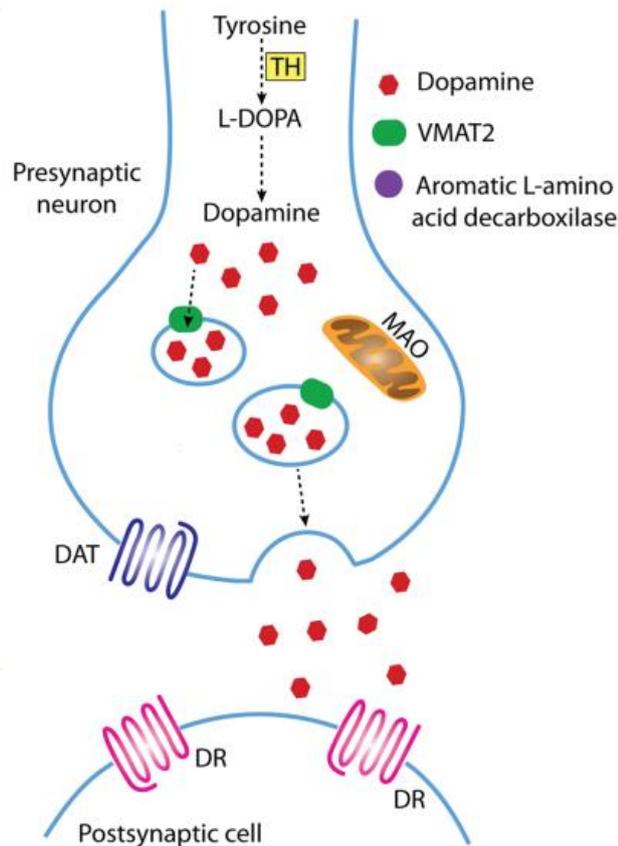


Figura 14: Esquema de la síntesis y liberación de DA (Klein *et al.*, 2019), con permiso de Springer Nature.

En el proceso de metabolización de la DA existen dos enzimas principales, la monoamino oxidasa (MAO) y la catecol-O-metiltransferasa (COMT). Los metabolitos finales más importantes son el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y el ácido homovanílico (HVA) (Rang y Dale, 2020) como se observa en la figura 15.

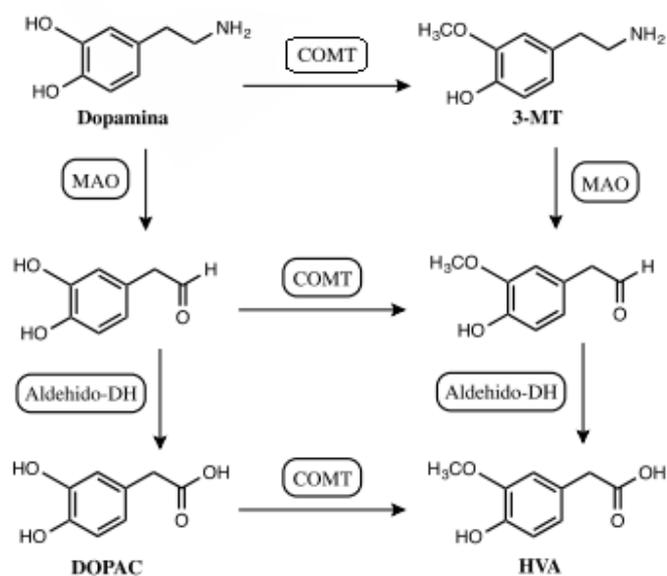


Figura 15: Principales vías del metabolismo de la dopamina en el encéfalo. Imagen modificada de Rang y Dale, (2020) con permiso de Elsevier.

En la EP, la cantidad de HVA se correlaciona con la progresión de la enfermedad. Por lo tanto, este metabolito puede ser un biomarcador útil ya que contribuye a la especificidad del diagnóstico (Klein *et al.*, 2019).

Los receptores de DA son miembros de la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y se han subdividido en dos familias principales: receptores tipo D₁, que incluye D₁ y D₅; y receptores tipo D₂, que tienen una mayor importancia farmacológica en el SNC y comprenden los subtipos D₂, D₃ y D₄ (Beaulieu *et al.*, 2014; Rang y Dale, 2020).

Además, existen dos variantes principales del receptor D₂ de DA que presentan propiedades anatómicas, fisiológicas, de señalización y farmacológicas distintas, y se clasifican como D_{2S} (D₂-corto) y D_{2L} (D₂-largo) (Beaulieu y Gainetdinov, 2011; Klein *et al.*, 2019).

Los receptores de clase D₁ (receptores D₁ y D₅) están acoplados principalmente a proteínas G_{αs/olf}, que estimulan la actividad de la adenililciclase (AC) y la producción del segundo mensajero AMPc. Se encuentran exclusivamente en el entorno postsináptico siendo el subtipo D₁ la forma predominante.

Por otro lado, los receptores de clase D₂ (receptores D_{2S}, D_{2L}, D₃ y D₄) están asociados con las proteínas G_{αi/o}, que disminuyen la actividad de la AC e inhiben la producción de AMPc. Los receptores D₂ y D₃ se expresan tanto postsinápticamente como presinápticamente en neuronas dopaminérgicas (Beaulieu *et al.*, 2014).

2.3.3 Fármacos antiparkinsonianos

Actualmente la EP no tiene cura, por lo tanto, el tratamiento actual se dirige únicamente a mejorar los síntomas derivados de la pérdida de neuronas dopaminérgicas. El tratamiento farmacológico convencional de la EP se centra en aumentar la acción dopaminérgica en las vías nigroestriatales (Figura 16) (Zhang *et al.*, 2021). Aunque las terapias dopaminérgicas siguen siendo el estándar de oro para el manejo sintomático de la EP, quedan varias necesidades no resueltas con respecto al tratamiento de los síntomas motores, no motores y para las intervenciones que modifican el curso clínico natural de la enfermedad (Connolly y Lang, 2014; Cristino *et al.*, 2020).

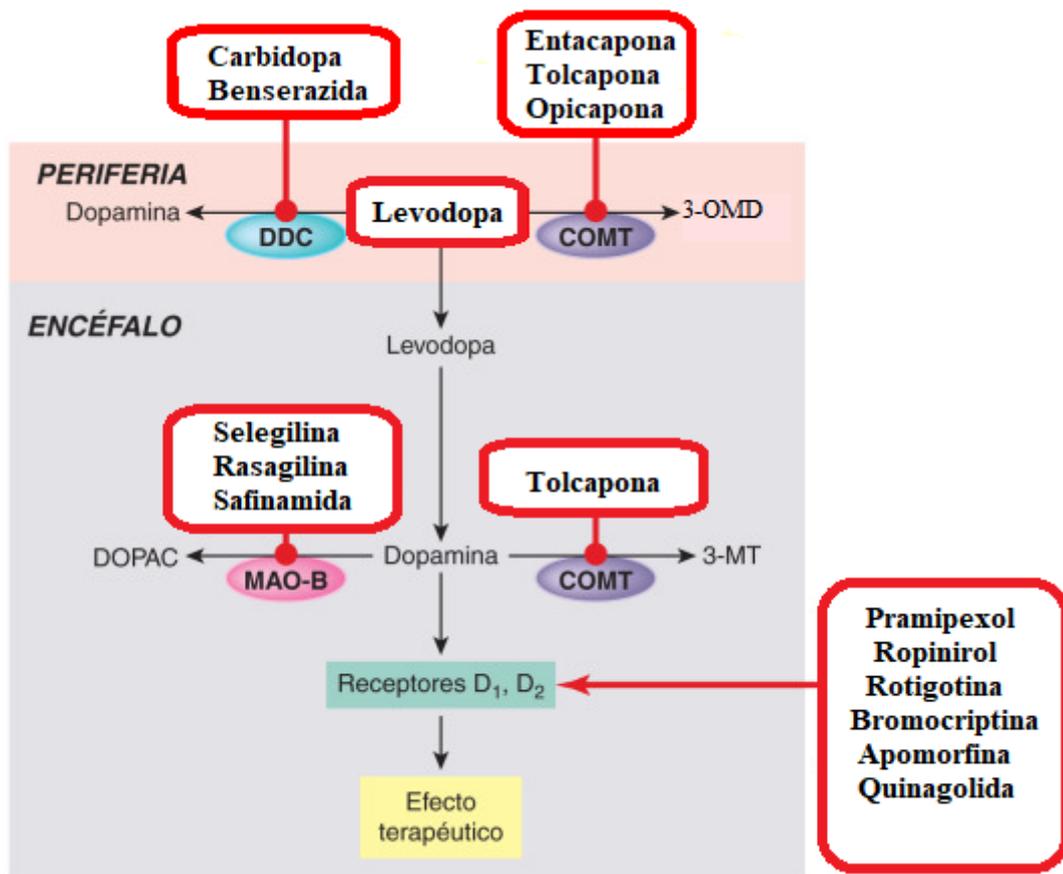


Figura 16: Lugares de acción de algunos fármacos utilizados para tratar la EP. Modificado de Rang y Dale, (2020) con permiso de Elsevier.

La elección de una determinada terapia debe ser hecha por un médico neurólogo que valorará la fase o estadio de la enfermedad, considerando que cada paciente posee características individuales y distintas respuestas al tratamiento. Además, hay que tener en cuenta otras variables a la hora de elegir el tratamiento, como la edad, la presencia de

comorbilidades, el coste-beneficio, la presencia de efectos indeseables, la politerapia y el número de veces que el paciente necesita tomar la medicación.

Entre los fármacos disponibles actualmente para tratar la EP, podemos mencionar la LD, los inhibidores de la DDC (IDDC), los inhibidores de la MAO (IMAO), los inhibidores de la catecol-o-metil-transferasa COMT (ICOMT), los agonistas dopaminérgicos, los antagonistas de los receptores muscarínicos de acetilcolina (anticolinérgicos) y otros (Katzung y Trevor, 2016; Raza *et al.*, 2019; Jankovic y Tan, 2020; Rang y Dale, 2020).

1. Levodopa (LD): en la actualidad es el fármaco más eficaz para el tratamiento de la EP, con más de 60 años de uso, significó un gran avance en el tratamiento de esta enfermedad ya que mejora los principales signos y síntomas como la rigidez, la bradicinesia y en menor medida el temblor (Beaulieu *et al.*, 2014).

La LD es considerada prácticamente inactiva, asumiendo que sus efectos, terapéuticos o adversos son debidos a su descarboxilación a DA (Katzung y Trevor, 2016).

Su semivida plasmática es corta (unas 2 horas) y, a medida que la enfermedad progresa, la eficacia de la LD disminuye gradualmente, desconociéndose el motivo. Puede ser debido a la progresión natural de la enfermedad, a la reducción del número de receptores y otros mecanismos de compensación (Rang y Dale, 2020).

Entre las reacciones adversas más destacadas de la LD están las discinesias, las fluctuaciones o las alucinaciones después de un tratamiento a largo plazo (Birtwistle y Baldwin, 1998; Beaulieu *et al.*, 2014).

2. Inhibidores de la DDC (IDDC): son fármacos que aumentan la biodisponibilidad de la LD, ya que cuando es administrada en monoterapia la biodisponibilidad es baja y solamente un porcentaje del 3-5% alcanza el SNC.

Los inhibidores más utilizados son la carbidopa y la benserazida (Katzung y Trevor, 2016). Se suele añadir al tratamiento con la LD un IDDC, ya que estos no atraviesan la barrera hematoencefálica (BHE), impidiendo así la transformación de la LD en DA a nivel periférico (Beaulieu *et al.*, 2014; Rang y Dale, 2020; Jankovic y Tan, 2020).

Además, la administración concomitante de un IDDC puede disminuir las necesidades diarias de la LD en casi 75% (Katzung y Trevor, 2016).

3. Inhibidores de la MAO (IMAO): los IMAO, preferentemente los que actúan sobre la isoforma B, como el deprenilo (también denominado selegilina), la rasagilina y la safinamida impiden la metabolización de la DA y la mantienen activa más tiempo en el espacio sináptico (Connolly y Lang, 2014; Armstrong *et al.*, 2020).

La selegilina y la rasagilina actúan como inhibidores irreversibles de la MAO-B. Ambas moléculas, y en especial la rasagilina, tienen una actividad antiapoptótica, al estabilizar la permeabilidad del poro mitocondrial, lo que les confiere propiedades neuroprotectoras. Sin embargo, la selegilina está asociada con la producción de metabolitos neurotóxicos de anfetaminas, reduciendo la intensidad del efecto neuroprotector (Bar-Am *et al.*, 2004).

La safinamida aprobada por la FDA, como fármaco antiparkinsoniano en 2016, es un inhibidor selectivo y reversible de la MAO-B que provoca un aumento de los niveles extracelulares de DA en el cuerpo estriado, pero también bloquea los canales de Na⁺ dependientes del voltaje y modula los canales de Ca²⁺, inhibiendo la liberación de glutamato (Blair y Dhillon, 2017).

Actualmente muchos investigadores están estudiando nuevas moléculas con potencial actividad como inhibidores de la MAO-B para el tratamiento de la EP, que se encuentran en etapas avanzadas de desarrollo (Zhang *et al.*, 2021). El bromuro de 1,3-bis-bencil-imidazolio y la benzopirona-biochanina-A son compuestos recientemente desarrollados como inhibidores de la MAO-B, incluso el primero demostró ser más eficaz que la selegilina en modelos de roedores (Zarmouh *et al.*, 2017; Chan *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2021).

4. Inhibidores de la COMT (ICOMT): son fármacos que inhiben principalmente la metilación periférica de la LD, aumentando la semivida de la misma y disminuyendo la formación del 3-O-metildopa (3-OMD), metabolito que compete con la LD por el sistema de transporte de aminoácidos neutros en la BHE. Actualmente en la práctica clínica tenemos tres fármacos disponibles que son la

tolcapona, la entacapona y la opicapona (Katzung y Trevor, 2016; Rodrigues y Ferreira, 2017).

La tolcapona y la entacapona son inhibidores selectivos e irreversibles de la COMT, mientras que la opicapona es un inhibidor selectivo y reversible. Estos fármacos prolongan la acción de la LD por disminuir su metabolismo periférico y consecuentemente su eliminación. La tolcapona es capaz de atravesar la BHE, por lo que también ejerce efectos centrales.

Estos fármacos son útiles en pacientes que sufren fluctuaciones de la respuesta con la LD (fenómenos on/off), dado que disminuyen la frecuencia de las fases off y la duración de las mismas, por lo que permiten un tiempo de acción más prolongado y la opción de reducir la dosis total diaria de la LD (Connolly y Lang, 2014; Katzung y Trevor, 2016; Lees *et al.*, 2017).

Dentro de las reacciones adversas, destaca la tolcapona por su asociación con casos de daños hepáticos, por lo que en Europa es de uso exclusivamente hospitalario. Puede ser frecuente la aparición de discinesias que se pueden controlar reduciendo la dosis de LD (Connolly y Lang, 2014).

5. Agonistas dopaminérgicos: son fármacos que estimulan los receptores de DA que se encuentran en la membrana celular de las neuronas de proyección estriatales. Las diferencias entre los distintos agonistas dopaminérgicos se basan en la afinidad por los diferentes subtipos de receptores (D₁, D₂, D₃), en la estructura química (ergóticos y no ergóticos) y semivida plasmática (Wood *et al.*, 2015; Katzung y Trevor, 2016).

Los agonistas de estructura ergótica (bromocriptina, lisurida, pergolida y cabergolina) pueden producir reacciones fibróticas serosas o valvulares cardiacas, por lo que, su utilización en la clínica es muy escasa. Una ventaja de la bromocriptina es que tiene una acción más duradera (semivida plasmática de 6-8 horas) que la LD, por lo que no es necesario administrarla con tanta frecuencia (Alonso-Cánovas *et al.*, 2014; Rang y Dale, 2020).

Los no ergóticos (ropinirol, pramipexol, rotigotina, apomorfina y quinagolida) son más aceptados que los anteriores y suelen ser utilizados como monoterapia en el tratamiento inicial de los pacientes de inicio anterior a los 70 años. Sin embargo,

tienden a producir episodios de sueño repentinos y alucinaciones (Alonso-Cánovas *et al.*, 2014; Yeung y Cavanna, 2014; Jankovic y Tan, 2020).

6. Anticolinérgicos: son fármacos clásicos que se utilizaron con amplitud en la terapéutica de la EP antes del descubrimiento de la LD. Actualmente son poco usados debido a sus notables efectos adversos (confusión mental, deterioro cognitivo, retención urinaria y estreñimiento).

Su mecanismo de acción se basa en el bloqueo de la actividad colinérgica de las interneuronas estriatales, cuya actividad está regulada por las neuronas dopaminérgicas que proyectan desde la sustancia negra. El bloqueo de receptores muscarínicos mejora el temblor, pero no la rigidez ni la bradicinesia. Son fármacos de este grupo, por ejemplo, el trihexifenidilo, el biperideno, la prociclidina, la benztropina y la orfenadrina (Katzung y Trevor, 2016; López Álvarez *et al.*, 2019).

7. Amantadina: es un fármaco antiviral que mostró ser capaz de inhibir la recaptación de DA y facilitar su liberación. También tiene cierta actividad como agonista dopaminérgico y como antagonista de receptores muscarínicos y glutamatérgicos del tipo NMDA. Es útil en las fases iniciales de la EP para mejorar la acinesia, la rigidez y el temblor (Rao *et al.*, 2006; Raza *et al.*, 2019). La amantadina no es tan eficaz como la LD o la bromocriptina y su acción disminuye rápidamente con el tiempo (Jankovic y Tan, 2020).

8. Antagonistas de los receptores de adenosina A_{2A}: debido a la co-localización e interacción funcional de los receptores de adenosina A_{2A} con los receptores D₂ de DA en las neuronas estriatales, la modulación con los antagonistas de A_{2A} tiene un efecto compensador sobre el déficit de DA causado por la degeneración de neuronas dopaminérgicas que se proyectan desde la sustancia negra al estriado, mejorando la disfunción motora (Soliman *et al.*, 2018).

En relación con las estrategias multi-dianas, recientemente la FDA aprobó el primer fármaco antagonista del receptor de adenosina A_{2A} Nourianz® (istradefylline) desarrollado por Kyowa Hakko Kirin Inc., Japón, como tratamiento complementario a la LD en la EP (Chen y Cunha, 2020).

También se ha estudiado el uso de inhibidores de la MAO-B con actividad antagonista del receptor de adenosina A_{2A}, que podrían proporcionar efectos sintomáticos y neuroprotectores, entre otros, en el tratamiento de la EP (Jaiteh *et al.*, 2018; Kuder *et al.*, 2020).

9. Cannabidiol (CBD): recientemente, al igual que en otras enfermedades neurológicas como la epilepsia, también se ha introducido el CBD en el tratamiento de la EP (Cristino *et al.*, 2020). A pesar de tener efectos beneficiosos probados en el tratamiento de la EP, su mecanismo de acción es complejo y sigue constantemente en estudio. Sin embargo, algunas hipótesis ya han sido bien documentadas, como la participación de ambos receptores canabinoides, CB₁ y CB₂, de los receptores TRPV1 y de los compuestos endocannabinoides (N-aracdonoil etanolamina o anandamida, y 2-aracdonoil glicerol o 2-AG) que se encuentran en grandes concentraciones en áreas del cerebro involucradas en el procesamiento y ejecución de movimientos corporales, como los ganglios basales (Suero-García *et al.*, 2015). Además, el CBD presenta actividades antioxidantes, anti-excitotóxicas y antiinflamatorias, proporcionando un efecto neuroprotector (Cristino *et al.*, 2020).

2.3.4 Modelo de reserpina

La reserpina fue uno de los primeros compuestos que se administraron a roedores para imitar la neuroquímica de la EP. Aunque se trata de un modelo animal algo básico, fue fundamental para demostrar la eficacia terapéutica de la LD, que sigue siendo el tratamiento de referencia en la EP (Tadaiesky *et al.*, 2006; Bispo *et al.*, 2019; Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2020).

A finales de la década de 1950, Carlsson *et al.*, (1957) demostraron por primera vez la capacidad de la LD, el precursor de la DA endógena, para revertir los llamados efectos *tranquilizantes* del pretratamiento con reserpina en ratones. Algún tiempo después, el efecto de la LD se recapituló en humanos, haciendo del modelo de reserpina un cribado sólido para la posible eficacia sintomática de nuevos fármacos en la EP.

La dosis habitual de reserpina puede variar de 1 a 5 mg/kg y puede administrarse por vía intraperitoneal o subcutánea. El mecanismo de acción se basa en el bloqueo del transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT2). Esto conduce a la pérdida de la capacidad de

almacenamiento y, por lo tanto, al agotamiento de la DA, noradrenalina y la serotonina (5-HT) (Duty y Jenner, 2011; Matos *et al.*, 2013).

Los cambios de comportamiento inducidos por reserpina en roedores se describen como acinesia, rigidez de las extremidades traseras y ataxia, que son características representativas de los síntomas asociados con la EP. La reversión de estos cambios se utiliza como indicador predictivo de la probable eficacia sintomática de nuevos agentes.

La hipotermia causada por reserpina en ratones también se produce por el bloqueo del VMAT2 que causa una disminución intensa y prolongada de DA en todas las terminaciones nerviosas dopaminérgicas, incluida la vía nigroestriatal (Freitas *et al.*, 2016).

Aunque el modelo de reserpina imita los componentes principales de la bioquímica de la EP e induce acinesia, rigidez, ataxia e hipotermia que reflejan las características clínicas de la enfermedad, no hay degeneración de células dopaminérgicas, por lo que el modelo se limita a evaluar nuevos enfoques para el tratamiento sintomático (Duty y Jenner, 2011).

Sin embargo, todos los fármacos dopaminérgicos y antagonistas muscarínicos que se utilizan actualmente en la clínica para controlar los síntomas de la EP se probaron primero en el modelo de reserpina (Colpaert, 1987; Menzaghi *et al.*, 1997; Duty y Jenner, 2011; Olaya *et al.*, 2019).

Dicha evidencia destaca la fuerte validez predictiva del modelo de reserpina en la EP y justifica su posición mantenida como un modelo clave de elección para las primeras etapas preclínicas de los protocolos de descubrimiento de fármacos.

2.4 NEUROINFLAMACIÓN

La inflamación es una secuencia de respuestas biológicas complejas y puede clasificarse como aguda o crónica. En la etapa aguda de la inflamación, las proteínas plasmáticas y los leucocitos de los vasos sanguíneos se filtran rápidamente a los sitios dañados para iniciar una serie de eventos bioquímicos y celulares que involucran al sistema inmunológico. La inflamación aguda suele remitir en unos pocos días, sin embargo, en algunas situaciones la inflamación persiste hasta que se vuelve crónica, desencadenando una compleja red de vías de señalización celular y molecular que están vinculadas a diversas patologías (Vezzani *et al.*, 2011; Dey *et al.*, 2016).

Estas vías de señalización, cuando se activan, secretan una variedad de factores inflamatorios, que incluyen citocinas proinflamatorias como la interleucina-1 β (IL-1 β) e

interleucina-6 (IL-6), el TNF- α , las enzimas óxido nítrico sintasa (iNOS) que producen EROS y la ciclooxigenasa 2 (COX2), los factores de crecimiento que incluyen el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y citocinas antiinflamatorias como la interleucina-10 (IL-10). Toda esta cascada de señalización contribuye a la patogenia del daño neuronal en muchas enfermedades del SNC, incluida la epilepsia y la EP (Hirsch y Hunot, 2009; Polazzi y Monti, 2010; Gullo *et al.*, 2014, Iughetti *et al.*, 2018, Cokyaman *et al.*, 2020).

En contrapartida, se sabe que el SNC tiene un sistema de protección inmunológico privilegiado, donde cuenta con una barrera de protección, la BHE, además de activar células endoteliales, microgliales y astrocitos en el proceso de reversión de la neuroinflamación (Dey *et al.*, 2016). Según Vezzani *et al.*, (2020), la respuesta neuroinmune realizada por las células gliales activadas tiene un papel dicotómico en el SNC. Por un lado, induce la activación de mecanismos de reparación y regeneración, mientras que, por el otro, la liberación incontrolada de mediadores inflamatorios estimula un estado neuroinflamatorio crónico, y es potencialmente peligroso para las células vecinas.

Algunos datos sugieren que la inflamación, que involucra células gliales activadas y una mayor expresión de mediadores inflamatorios específicos, puede contribuir a la epileptogénesis, debido a la excitabilidad neuronal alterada, favoreciendo así el establecimiento de una red de hiperexcitabilidad neuronal crónica que puede generar crisis espontáneas recurrentes (Devinsky *et al.*, 2013, Wang *et al.*, 2015).

Además, estudios pos-mortem tanto celular como molecular del tejido cerebral de pacientes con EP ponen de manifiesto que existen procesos neuroinflamatorios en las regiones cerebrales afectadas por la enfermedad (Boka *et al.*, 1994; Hunot *et al.*, 1996; Mogi *et al.*, 2000). Aún no se sabe si tales cambios están involucrados en el proceso patológico o son simplemente una consecuencia de la degeneración neuronal. Aunque estudios *in vivo* en pacientes con la EP han detectado cambios inflamatorios durante el curso de la enfermedad, antes de la muerte del paciente y están asociados con la progresión de la enfermedad de manera directa o indirecta (Dobbs *et al.*, 1999; Krüger *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2008; Hirsch y Hunot, 2009).

2.5 GAMMA-DECANOLACTONA

Hace muchos años que las lactonas son estudiadas para el tratamiento de las enfermedades neurológicas (Ferrendeli *et al.*, 1989; Holland *et al.*, 1992) y todavía hoy en día se siguen

estudiando (Zhou *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2020). Estas sustancias han sido reconocidas por sus propiedades neuroactivas; entre ellas, efectos anestésicos, hipnóticos y anticonvulsivos (Ferrendelli *et al.*, 1989; Duke, 1992; Viana *et al.*, 2006; de Oliveira *et al.*, 2008; Pfluger *et al.*, 2018a,b).

La tiobutirilactona ha mostrado tener acción anticonvulsiva con menos efectos adversos y acción más prolongada en comparación con un medicamento convencional utilizado en clínica: el valproato de sodio (Ferrendelli *et al.*, 1989). Un estudio realizado por Warnecke *et al.*, (2020) demostró que las lactonas macrocíclicas como ivermectina y moxidectina mejoran la actividad motora de ratones tratados con la 6-hidroxiopamina (6-OHDA), un fármaco neurotóxico que destruye las terminaciones dopaminérgicas, lo que nos lleva a pensar que las lactonas también pueden ser útiles en el tratamiento de otras enfermedades neurológicas como la EP.

La gamma-decanolactona (Figura 17) es un compuesto sintético monoterpénico con una estructura química similar a las lactonas presentes en el aceite esencial de la planta *Aeollanthus suaveolens*, que se utiliza en etnomedicina por nativos de la Amazonia, por sus supuestas características medicinales (sedante, anticonvulsiva, analgésica, hipnótica y ansiolítica) (Elisabetsky *et al.*, 1995).

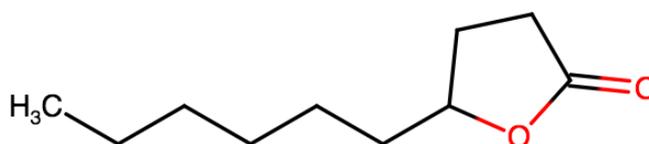


Figura 17: Estructura bidimensional de la GD. Imagen creada por la autora utilizando la herramienta Marvin JS.

Estudios previos realizados por Coelho De Souza *et al.*, (1997) han mostrado que la GD presenta actividad hipnótica, hipotérmica y anticonvulsiva en ratones. Además, la evaluación realizada a través de un ensayo de *binding* mostró que la GD fue capaz de inhibir de manera concentración-dependiente la unión específica de L-[3H]-glutamato, y que esta acción puede estar involucrada en la actividad anticonvulsiva de esta lactona (Pereira *et al.*, 1997).

Cuando se probó en los modelos experimentales de natación forzada (test Porsolt) y en el laberinto elevado en cruz, la GD no mostró ningún efecto, lo que sugiere que no hay actividad antidepressiva ni ansiolítica (Viana *et al.*, 2007). En el modelo de *Kindling*, considerado un

modelo importante de epileptogénesis, la GD mostró un efecto protector significativo en las crisis inducidas por PTZ y también demostró actividad antígenotóxica, ya que reparó el daño al ácido desoxirribonucleico (ADN) inducido por PTZ (de Oliveira *et al.*, 2008).

Estudios más recientes han puesto de manifiesto que la GD atenúa la activación de células microgliales (N9) en el modelo de lipopolisacárido (LPS). Concomitantemente, también se ha visto que la GD disminuye la expresión de marcadores inflamatorios como iNOS, TNF- α y, en consecuencia, inhibe la formación de EROS. Además, la GD bloquea marcadores de apoptosis como la fosforilación de p38-MAPK y la activación de caspasa-9, disminuyendo el daño causado al ADN. Estos datos indican que la GD tiene un potencial terapéutico neuroprotector y que ejerce sus efectos mediante la inhibición de la neuroinflamación (Pflüger *et al.*, 2016).

En un modelo agudo de crisis epilépticas inducidas por pilocarpina, los ratones que recibieron la dosis de 300 mg/kg de la GD mostraron un aumento de la latencia para la aparición de la primera crisis epiléptica. En los análisis bioquímicos, tanto la dosis de 300 mg/kg como la de 100 mg/kg de la GD, protegieron a los animales del estrés oxidativo y el daño al ADN producido por la pilocarpina. En este mismo estudio, la GD fue eficaz en la prueba de Ames, un ensayo consolidado de mutagenicidad (Pflüger *et al.*, 2018a).

También se evaluó el perfil farmacológico y los posibles mecanismos de acción de la GD en modelos animales de crisis epilépticas agudas inducidas por el compuesto isoniazida (INH) (inhibidor de la síntesis de GABA), PCT (actúa bloqueando el canal de cloruro del receptor de GABA_A) y 4-aminopiridina (4-AP) (antagonista selectivo de los canales de K⁺).

Los experimentos pusieron de manifiesto un aumento en la latencia para la aparición de la primera crisis, así como una disminución en el porcentaje de crisis en los modelos INH y 4-AP en animales que recibieron una dosis de 300 mg/kg de GD. La GD no resultó eficaz en las crisis inducidas por PCT. Los resultados de este estudio sugieren que el efecto de la GD en las crisis puede estar relacionado con su capacidad para modular de forma positiva la enzima GAD (responsable de la síntesis de GABA) y activar, directa o indirectamente, los canales de K⁺ (Pflüger *et al.*, 2018b).

JUSTIFICACIÓN

3 JUSTIFICACIÓN

Esta tesis se encuadra en un convenio de colaboración internacional (cotutela) entre la Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) de Brasil, y la Universidade de Santiago de Compostela (USC) de España.

Las enfermedades neurológicas son una de las principales causas de discapacidad en el mundo, comprometiendo la vida de miles de personas anualmente. Entre ellas se encuentran enfermedades muy prevalentes como la epilepsia y la EP, que causan un gran impacto tanto en la vida del paciente como en la vida de sus familiares, convirtiéndose en un problema social.

La falta de un tratamiento eficaz y seguro, capaz de detener o revertir el proceso y no solo mitigar los síntomas, justifica la necesidad e importancia de la prospección de nuevos compuestos potenciales candidatos a fármacos.

Dada la complejidad de nuestro cerebro y más aún de la etiología multifactorial de la epilepsia y la EP, la única manera de poder avanzar en el tratamiento de estas enfermedades es por medio de la investigación. Ambas enfermedades comparten mecanismos fisiopatológicos similares como el aumento de la excitotoxicidad y de las citocinas proinflamatorias y apoptóticas, entre otros. También se ha visto que pacientes que desarrollan la EP antes de los 60 años tienen 87 veces más probabilidades de desarrollar crisis epilépticas, lo cual puede acelerar el deterioro cognitivo.

Dicho esto, se hace necesario disponer de compuestos con diferentes actividades farmacológicas, capaces de actuar de forma simultánea sobre múltiples dianas terapéuticas implicadas en la patogenia de las enfermedades.

En esta tesis doctoral se realiza una evaluación farmacológica de la GD para comprobar su potencial efecto beneficioso en el tratamiento de la epilepsia y la EP. Como ya se mencionó, la GD tiene una estructura química similar a las lactonas presentes en el aceite esencial de la planta *Aeollanthus suaveolens*, que se utiliza en etnomedicina por nativos de la Amazonia, por sus supuestas características medicinales.

Este estudio es una continuación/ampliación de la investigación previa de la GD realizada en las dos universidades, donde se ha puesto de manifiesto su capacidad para actuar en el SNC.

En resumen, esta tesis representa una oportunidad única para generar nuevo conocimiento sobre el mecanismo de acción de la GD y su potencial aplicación en dos enfermedades neurológicas prevalentes.

OBJETIVOS

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo general es profundizar en el conocimiento de los efectos neurofarmacológicos y los mecanismos de acción de la GD con la finalidad de valorar su potencial aplicación en clínica para el tratamiento de la epilepsia y la EP.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1 Evaluar el efecto de la gamma-decanolactona en estudios computacionales (*in silico*):

- a) Predicción de las propiedades fisicoquímicas.
- b) Predicción de la capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica.
- c) Estudio de *molecular docking* sobre las isoformas MAO.

4.2.2 Evaluar el efecto anticonvulsivo de la gamma-decanolactona:

a) Estudio *in vitro*:

- a.1) Estudio de la unión a receptores de adenosina A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃.

b) Estudios *in vivo*:

- b.1) Latencia y manifestación de crisis epilépticas agudas inducidas por AMINOPH.

b.1.1) Implicación del sistema purinérgico.

- b.2) Latencia y manifestación de crisis epilépticas subcrónicas inducidas por PTZ

Kindling.

- b.2.1) Implicación del sistema GABAérgico y purinérgico.

c) Estudio *ex vivo*:

- c.1) *Western blotting*: Evaluación de expresión de proteínas GABA_A α 1 y adenosina A₁.

4.2.2 Evaluar el efecto antiparkinsoniano de la gamma-decanolactona:

a) Estudios *in vitro*:

a.1) Inhibición enzimática: MAO-A, MAO-B.

a.2) Estudio de citotoxicidad (MTT).

b) Estudios *in vivo*:

b.1) Ensayo de la coordinación motora - *Rota-rod test*.

b.2) Modificación de la temperatura corporal.

b.3) Ensayo de la actividad locomotora - *Open Field Test (OFT)*.

MATERIAL Y MÉTODOS

5 MATERIAL Y MÉTODOS

En este capítulo se reproducen contenidos de la publicación de la doctoranda en la revista *Behavioural Pharmacology*. Editorial: Wolters Kluwer Health, Inc. ISSN: 0955-8810.

Pflüger P, Regner GG, Luft JG, Gonçalves DA, Krebs C, Fontenla JA, Pereira P. Gamma-decanolactone attenuates acute and chronic seizures in mice: a possible role of adenosine A₁ receptors. *Behav Pharmacol*. 2020 Sep;31(6):544-552. doi: 10.1097/FBP.0000000000000554.

Autoría: Pricila Pflüger^{a,b}

Coautoría: Gabriela Gregory Regner^a, Jordana Griebler Luft^a, Débora Aguirre Gonçalves^a, Chris Krebs^a, José Angel Fontenla^b, Patrícia Pereira^a.

Filiación: ^aDepartamento de Farmacología, Laboratorio de Neurofarmacología y Toxicología Preclínica, Instituto de Ciencias Básicas de la Salud, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. ^bDepartamento de Farmacología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España.

Los experimentos descritos en esta tesis han sido realizados en la Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), en la Universidade de Santiago de Compostela (USC) y en la Università de Cagliari (UniCA), Italia.

Los estudios llevados a cabo en la UFRGS se han realizado en el laboratorio de Neurofarmacología y Toxicología Pre-clínica (LABNET), coordinado por la Prof. Patricia Pereira.

Los estudios llevados a cabo en la USC se han realizado en:

- Laboratorio del grupo de investigación BioFarma (CiMUS), coordinado por la Prof. M^a Isabel Loza.
- Laboratorio del grupo de investigación de Fisiología y Farmacología de las enfermedades crónicas (CiMUS), coordinado por la Prof. Dolores Viña.
- Laboratorio del grupo de investigación de Farmacología del Sistema Nervioso Central (Facultad de Farmacia), coordinado por el Prof. José A. Fontenla.

El estudio en la UniCA se ha realizado en el laboratorio de Ingeniería Eléctrica y Electrónica, bajo la dirección del Prof. Amit Kumar.

5.1 ESTUDIOS COMPUTACIONALES (*IN SILICO*)

5.1.1 Predicción de las propiedades fisicoquímicas

Para conocer las propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas de la GD, tales como la absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) y comparar sus resultados con los inhibidores de la MAO de referencia, selegilina, rasagilina y safinamida hemos realizado cálculos teóricos utilizando el programa Molinspiration (Molinspiration Cheminformatics, <https://www.molinspiration.com/>).

Este programa permite calcular parámetros como la lipofilia (expresada como miLog P), el peso molecular (MW), el área de superficie polar topológica (TPSA), el número de donadores de enlaces de hidrógeno (nOHNH), el número de aceptores de hidrógeno (nON) y el volumen molecular (MV).

La regla de los 5 de Lipinski (Lipinski *et al.*, 1997) establece las características que una molécula debe tener para ser un buen fármaco:

- **Lipofilia:** Es una característica decisiva para que un fármaco se absorba, distribuya, metabolice y elimine. Se define $\log P$ como el coeficiente de reparto de una especie única entre dos fases en equilibrio, una oleosa y otra acuosa. Cuanto mayor sea el valor de $\log P$, mayor será la liposolubilidad del fármaco y cuanto menor el $\log P$, mayor será la solubilidad en agua. La recomendación es que el $\log P$ sea inferior a 5.
- **Peso molecular:** En general se recomienda que las moléculas posean un peso molecular inferior a 500 Da para que presenten buenas propiedades moleculares para su absorción.
- **Donantes de enlaces de hidrógeno:** Se considera como tal cualquier heteroátomo con al menos un hidrógeno (H) unido. Se recomienda que la molécula no tenga más de 5 donadores de enlaces de H para que tenga una biodisponibilidad satisfactoria.

- **Aceptores de enlaces de hidrógeno:** Se considera como tal cualquier heteroátomo sin una carga positiva formal, excluyendo halógenos, grupos pirrol, nitrógeno, oxígeno y azufre heteroaromáticos, y estados de oxidación más altos de nitrógeno, fósforo, y azufre, pero incluyendo los oxígenos unidos a ellos. Se recomienda que la molécula no tenga más de 10 aceptores de enlaces de H.

- **Área de superficie polar:** Es un parámetro que se define como la suma de las superficies de los átomos polares (generalmente oxígenos, nitrógenos e hidrógenos unidos) en una molécula. Es útil para la predicción de las propiedades de pase de fármacos a través de membranas, como por ejemplo la penetración en la BHE.

5.1.2 Predicción de la capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica

La predicción del cruce de la BHE se evaluó con el programa online, *CBLigand-BBB* (<https://www.cbligand.org/BBB/>); con la aplicación de dos algoritmos, *support vector machine* (SVM) y AdaBoost; y con cuatro tipos de huellas dactilares, MACCS, Open Babel (FP2), Molprint 2D y PubChem (Liu *et al.*, 2014). El programa proporciona una puntuación predictiva mayor que 0 si el compuesto analizado puede atravesar la BHE.

5.1.3 Estudio de *molecular docking* sobre las isoformas MAO

La estructura bidimensional del ligando GD se obtuvo utilizando la herramienta Marvin JS (www.chemaxon.com) y se convirtió a tridimensional (3D) utilizando el software Open Babel (O'Boyle *et al.*, 2011).

La estructura 3D de la GD se sometió a optimización geométrica dentro del marco de la teoría funcional de la densidad (Becke, 1993) utilizando el conjunto de bases gaussianas 6-31G * (Rassolov *et al.*, 2001) en combinación con funcional B3LYP (Lee *et al.*, 1988). La estructura 3D de las dianas hMAO-B (ID de PDB: 2V61) y hMAO-A (ID de PDB: 2Z5Z) se obtuvieron del banco de datos de proteínas (*Protein Data Bank* - <https://www.rcsb.org/>).

Para evaluar y comprender como la GD se une a las dianas moleculares MAO-B y/o MAO-A, se realizaron estudios de *docking* con el servidor web COACH-D (Wu *et al.*, 2018), mediante la implementación de un consenso entre cinco métodos individuales: TM-SITE, S-SITE (Yang *et al.*, 2013), FINDSITE (Brylinski y Skolnick, 2008), COFACTOR (Roy *et al.*, 2012) y ConCavity (Capra *et al.*, 2009), para predecir las interacciones proteína-ligando.

Luego se empleó el programa AutoDock Vina (Trott *et al.*, 2010) para seleccionar la mejor posición del ligando predefinidas.

5.2. ESTUDIOS *IN VITRO*

5.2.1 Estudio de la actividad inhibidora de la MAO

5.2.1.1. Fármacos y reactivos

Los fármacos y los reactivos utilizados en los experimentos fueron la selegilina y la GD suministrados por Sigma-Aldrich (S.A.) (St. Louis, Missouri, EE. UU.), el DMSO y la moclobemida suministrados por los laboratorios Hoffmann-La Roche (Basilea, Suiza), la sal sódica de resorruфина, el hidrocloreuro de *p*-tiramina, el tampón fosfato sódico y la peroxidasa de rábano picante suministrados en el kit para el ensayo de la MAO Amplex[®] Red Molecular Probes (S.A.) (Waltham, Massachusetts, EE. UU.).

Disoluciones stock de concentración 10 mM de los fármacos y de la GD fueron preparadas y mantenidas a -20 °C para su conservación. La moclobemida y la GD se disolvieron en DMSO (concentración final de DMSO \leq 1%) y la selegilina se disolvió en agua Milli-Q. En el día de la realización del experimento, a partir de las disoluciones stock, se realizaron las adecuadas diluciones empleando el mismo vehículo utilizado anteriormente.

El tampón fosfato sódico proporcionado a una concentración 5 veces superior a la necesaria en el Kit de MAO Amplex[®] Red se diluyó en agua Milli-Q hasta la concentración adecuada.

El 10-acetil-3,7-dihidroxi-fenoxazina (Amplex[®] Red) se preparó en una concentración de 20 mM, disolviéndose en DMSO; el hidrocloreuro de *p*-tiramina se preparó en una concentración de 100 mM, disolviéndose en agua Milli-Q; y la peroxidasa de rábano picante se preparó en una concentración de 200 U/mL, disolviéndose en el tampón fosfato sódico (1X).

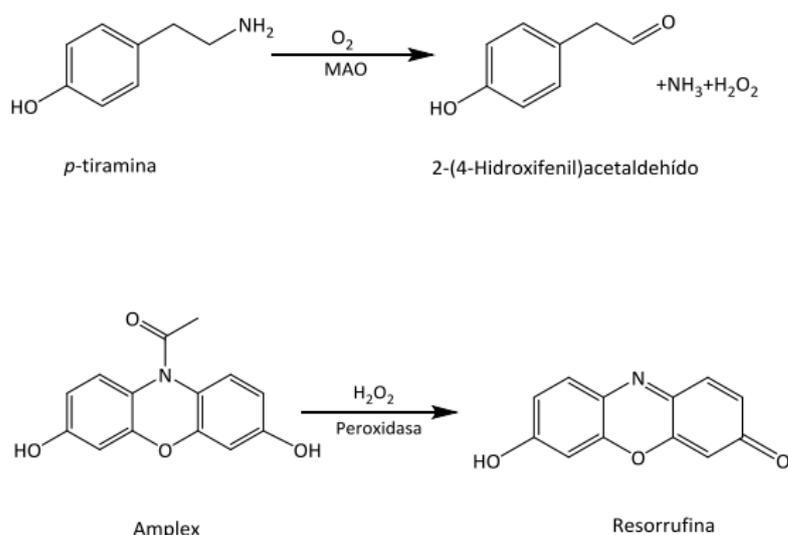
El Amplex[®] Red y la GD se mantuvieron en todo momento protegidos de la luz debido a su fotosensibilidad.

5.2.1.2 Determinación de la inhibición de las isoformas de la MAO

Los potenciales efectos de GD sobre la actividad de las isoformas de la MAO se determinaron midiendo la producción de H_2O_2 y, por consiguiente, de resorufina a partir de *p*-tiramina (4-hidroxi-feniletilamina), utilizando el reactivo Amplex® Red y las isoformas de la MAO, presentes en la fracción microsomal, preparada a partir de células de insectos (BTI-TN-5B1-4) infectadas con baculovirus recombinantes que contienen insertos de ADNc de MAO-A o MAO-B humano (Sigma Aldrich S.A.) (St. Louis, Missouri, EE. UU.).

Estas isoformas de la MAO catalizan la oxidación de varios sustratos que contienen restos de amino para originar los aldehídos correspondientes, amoníaco y H_2O_2 . La *p*-tiramina, que es oxidada a 4-hidroxifenilacetaldehído, es un sustrato común para la MAO-A y para la MAO-B.

La producción de H_2O_2 catalizada por las isoformas de la MAO se puede detectar utilizando el reactivo Amplex® Red, una sustancia no fluorescente, altamente sensible, que reacciona con el H_2O_2 en presencia de la peroxidasa del rábano picante para producir una sustancia fluorescente: la resorufina (Figura 18).



**Figura 18. Esquema de las reacciones catalizadas por las isoformas de la MAO y la peroxidasa.
Protocolo del ensayo de inhibición de la MAO.**

En nuestros experimentos, la actividad de la MAO fue evaluada con el método mencionado anteriormente, siguiendo un procedimiento general, previamente descrito, con algunas modificaciones (Matos *et al.*, 2013; Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2020).

En primer lugar se incubaron 0,1 mL de tampón fosfato sódico (50 mM, pH 7,4) que contiene distintas concentraciones de la GD (concentración final de DMSO \leq 1%) o los

inhibidores de referencia, y la cantidad de MAO-A o MAO-B recombinante humana requerida para obtener, en nuestras condiciones experimentales, la misma velocidad de reacción; es decir, para oxidar (en ausencia de los compuestos: grupo control) la misma concentración de sustrato: 165 pmoles de *p*-tiramina por min (MAO-A; 1,1 µg; actividad específica: 150 nmoles de *p*-tiramina oxidados a *p*-hidroxifenilacetaldehído por min por mg de proteína; MAO-B: 7,5 µg; actividad específica: 22 nmoles de *p*-tiramina transformados por min por mg de proteína). Dicha incubación se realizó durante 10 min a 37 °C en placas de 96 pocillos de fondo negro y plano (*MicrotestTM 96 well assay plate*, BD Biosciences) (Franklin Lakes, New Jersey, EE. UU.) ya colocadas en la cámara oscura del lector de fluorescencia. Después del periodo de incubación, la reacción se inició añadiendo (concentraciones finales) 200 µM de reactivo Amplex[®] Red, 1 unidad (U)/mL de peroxidasa de rábano picante y 1 mM de *p*-tiramina como sustrato, tanto para los estudios realizados con la MAO-A como para los realizados con la MAO-B.

La producción de H₂O₂ y, por consiguiente, de resorufina fue cuantificada a 37 °C en un lector de fluorescencia de placa (Fluo-star OptimaTM, BMG LABTECH) (Waltham, Massachusetts, EE. UU.) determinando la fluorescencia generada ($\lambda_{\text{excitación}}$ 545 nm, $\lambda_{\text{emisión}}$ 590 nm) durante 10 min, período en el cual el incremento de la fluorescencia fue lineal desde el principio. Simultáneamente se llevaron a cabo experimentos control sustituyendo nuestro compuesto o los inhibidores de referencia con las disoluciones apropiadas de los vehículos.

La evaluación de la inhibición enzimática producida por nuestro compuesto se determinó mediante la variación de fluorescencia por unidad de tiempo (cuantificada como unidades arbitrarias de fluorescencia/min). De esta forma se midieron los moles de resorufina generados, que coinciden con los moles de 2-(4-hidroxifenil)-acetaldehído, ya que la reacción química presenta una estequiometría 1:1.

5.2.1.3 Reversibilidad de la inhibición de la MAO-B

Para evaluar si la GD es un inhibidor de hMAO-B reversible o irreversible se utilizó un método de dilución y como fármaco de referencia se utilizó la selegilina (inhibidor irreversible de la MAO-B) (Gerlach *et al.*, 1992; Copeland, 2005).

En primer lugar, se preparó una disolución de la GD 10 veces superior a su valor de CI₅₀. Posteriormente, se preparó una disolución de la enzima MAO-B 100X (en relación con la concentración utilizada en los experimentos para la determinación de la inhibición de la

actividad enzimática antes descritos) en tampón fosfato sódico (50 mM, pH 7,4). Se añadieron 0,2 μL de la disolución de compuesto sobre 1,8 μL de la disolución de la enzima y las disoluciones obtenidas se incubaron en hielo durante 30 min. De este modo, si la inhibición ejercida por el compuesto es irreversible, este permanecería unido a pesar de la dilución de la muestra; mientras que si se trataba de un inhibidor reversible, se desligaría de la enzima, recuperándose la actividad de la misma en un porcentaje elevado. En los experimentos control se utilizó el vehículo DMSO $\leq 1\%$.

Una vez transcurrido el periodo de incubación, las diferentes disoluciones se diluyeron 100 veces con tampón fosfato, añadiendo 198 μL del mismo. Posteriormente, se tomaron 50 μL de cada una de las disoluciones, que se llevaron a una placa de 96 pocillos de fondo negro y plano (Microtest™ 96 well assay plate, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.), incubándose a continuación a 37 °C durante 3 min. Posteriormente, se añadieron 50 μL de tampón fosfato conteniendo una mezcla de *p*-tiramina, peroxidasa de rábano picante y Amplex® Red a las concentraciones descritas previamente. Finalmente, se determinó la fluorescencia generada como se describe en el apartado anterior.

5.2.1.4 Expresión de los resultados, análisis estadístico y representación gráfica

La actividad IMAO de la GD y de los fármacos de referencia se expresó como CI_{50} , es decir, como la concentración de cada compuesto necesaria para producir una disminución de la actividad enzimática de las isoformas de la MAO de un 50%. Los correspondientes valores de las CI_{50} fueron calculados utilizando el programa informático Microsoft Office Excel. Para ello se representó gráficamente el logaritmo de la concentración molar del compuesto estudiado en el eje de abscisas, frente al porcentaje de inhibición de la MAO en el eje de ordenadas. Como resultado se obtuvo una gráfica de forma sigmoide, en la que existía una relación lineal entre el logaritmo de la concentración de los compuestos y el porcentaje de inhibición de la MAO. Los valores de CI_{50} se obtuvieron a partir de las ecuaciones de las rectas obtenidas por regresión lineal (método de mínimos cuadrados) de los puntos resultantes de esta representación.

Además, se calculó el cociente $[\text{CI}_{50} (\text{MAO-A})] / [\text{CI}_{50} (\text{MAO-B})]$ como indicador del índice de selectividad en la inhibición mostrada sobre ambas isoformas.

Para la determinación de la reversibilidad se calculó el porcentaje de la pendiente ($\Delta\text{UF}/t$) respecto al control. Para los inhibidores reversibles, el incremento de fluorescencia muestra

un progreso lineal alcanzando al menos el 91% de la pendiente del control, mientras que si la inhibición es irreversible se alcanza solo el 9% de esta pendiente. La representación gráfica se realizó con el programa informático GraphPad Prism (V 5.0) (San Diego, EE.UU.).

5.2.2 Cultivo de células hepáticas HepG2

En estos experimentos se utilizaron células de la línea HepG2 (ATCC[®], American Type Culture Collection, Virginia, EE. UU.), las cuales fueron proporcionadas por el grupo de investigación Biofarma (CiMUS, USC). Las células HepG2 corresponden a una línea celular de hepatocarcinoma de humano caucasiano. Esta línea celular es una de las más utilizadas para determinar la potencial hepatotoxicidad de fármacos en estudio.

El medio de cultivo para las células HepG2 fue el *Minimum Essential Medium Eagle* (EMEM) (Sigma-Aldrich S.A.) (St. Louis, Missouri, EE. UU.), suplementado con suero bovino fetal (FBS) 10%, penicilina (100 IU/mL) y estreptomycin (100 µg/mL) (Gibco/Invitrogen S.A.) (Waltham, Massachusetts, EE. UU.).

Las células se cultivaron en *flask* de 75 cm² en un incubador (Forma Direct Heat CO₂, Thermo Electron Corporation) (Waltham, Massachusetts, EE. UU.) en condiciones de humedad saturada con una presión parcial de CO₂ del 5% y a 37 °C, hasta alcanzar la confluencia (90-95%) de la superficie del flask. El medio se cambió cada dos días.

Posteriormente, se realizaron subcultivos a una superficie 3 veces mayor. Para ello, se aspiró el medio de cultivo, se lavaron las células con PBS (tampón fosfato salino) y se trataron las células con una solución de tripsina-EDTA 0,05% (Sigma-Aldrich S.A.) (St. Louis, Missouri, EE. UU.) durante 5 min a 37 °C. Tras comprobar la proteólisis de la matriz extracelular, la suspensión resultante se diluyó 1:1 en medio de cultivo y se centrifugó a 100 g durante 5 min a 20-22 °C. El pellet obtenido se resuspendió en el medio de cultivo completo y se sembró en nuevos flask de 75 cm².

Para la realización de los experimentos, las células se sembraron en placas estériles de 96 pocillos (Microtest[™] 96 well assay plate, BD Biosciences.) (Franklin Lakes, New Jersey, EE. UU.) a una densidad celular de 1x10⁶ cél/mL y crecieron, distribuidas en alícuotas de 100 µL, durante 24 h en las mismas condiciones anteriormente descritas.

5.2.2.1 Determinación de la citotoxicidad celular

Las células se mantuvieron en las condiciones antes descritas durante 48 horas hasta alcanzar la confluencia en el pocillo. Seguidamente, se trataron con distintas concentraciones de la GD (10 μ M, 25 μ M, 50 μ M y 100 μ M) disuelta en DMSO (concentración final de DMSO 1%) para evaluar el efecto citotóxico de la misma.

Una vez añadida la GD, las células se incubaron durante 24 horas. Transcurrido el periodo de incubación, se determinó la viabilidad de las células utilizando el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) (Sigma-Aldrich S.A.) (St. Louis, Missouri, EE. UU.). Este compuesto de color amarillo es reducido a formazán, (cristales azul-violáceos insolubles en agua) por enzimas deshidrogenasas presentes en las mitocondrias de las células viables (Mossman, 1983) (Figura 19).

Se añadieron 10 μ L de MTT (5 mg/mL en tampón PBS) a cada pocillo conteniendo 100 μ L de medio. Tras incubar 2 horas a 37 $^{\circ}$ C, se retiró el medio y los cristales de formazán formados se resuspendieron en 100 μ L/pocillo de DMSO. La producción de formazán por las células viables fue cuantificada a 37 $^{\circ}$ C en un lector de absorbancia (Fluo-star Optima, BMG LABTECH) (Ortenberg, Ortenaukreis, Alemania). La lectura se realizó a $\lambda = 570$ nm.

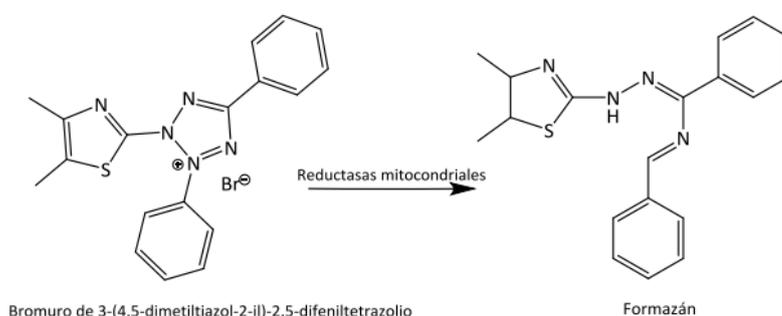


Figura 19: Reacción de reducción de MTT a formazán. Protocolo del ensayo de MTT.

5.2.2.1.1 Expresión de los resultados, análisis estadístico y representación gráfica

Los resultados se expresan como el porcentaje de viabilidad de las células HepG2 tratadas con la GD respecto a células tratadas con DMSO 1% (vehículo en el que se ha disuelto la GD), usado como control.

El porcentaje de viabilidad celular se obtiene utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ viabilidad} = (\text{Abs}_{\text{-células tratadas}} / \text{Abs}_{\text{-control}}) \times 100$$

El porcentaje de viabilidad representa la media \pm error estándar de la media (e.e.m.) de al menos 3 experimentos. Para las representaciones gráficas y el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism[®] (v 5.0) (San Diego, USA). Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante el test ANOVA de una vía, seguido del test de Dunnet.

5.2.3 Evaluación de la unión de la GD a receptores de adenosina

5.2.3.1 Receptores de adenosina A₁:

Los experimentos de unión competitiva del receptor de adenosina A₁ se llevaron a cabo en una placa de 96 pocillos GF/C (Millipore, Madrid, España) pretratada con tampón de unión (ácido 2-[4-(2-hidroxietil) piperazin-1-il] etanosulfónico (Hepes) 20 mM, NaCl 100 mM, dicloruro de magnesio (MgCl₂) 10 mM y 2 U/ml de adenosina desaminasa, pH=7,4). En cada pocillo se incubaron 5 μ g de membranas de la línea celular Euroscreen de ovario de hámster chino-A₁ (CHO-A₁) que se prepararon en el laboratorio (Lote: A002/13-04-2011, concentración de proteína = 5864 μ g/mL), 1 nM [3H]-DPCPX (137 Ci/mmol, 1 mCi/ml, Perkin Elmer NET974001MC) y GD o estándar. La unión no específica se determinó en presencia de (R)-N6-(1-metil-2-feniletíl) adenosina (R-PIA) 10 μ M (Sigma P4532). La mezcla de reacción (Vt: 200 μ L/pocillo) se incubó a 25°C durante 60 min, luego se filtró y se lavó cuatro veces con 250 μ L de tampón de lavado (Hepes 20 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM pH=7,4), antes de medir en un contador de centelleo beta de microplaca (MicrobetaTrilux, PerkinElmer, Madrid, España) (Klotz *et al.*, 1998).

5.2.3.2 Receptores de adenosina A_{2A}:

Los experimentos de unión competitiva del receptor de adenosina A_{2A} se llevaron a cabo en una placa de 96 pocillos GF/C (Millipore, Madrid, España) pretratada con tampón de unión Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, MgCl₂ 10 mM, 2 U/ml de adenosina desaminasa, pH = 7,4). En cada pocillo se incubaron 5 μ g de membranas de la línea celular epitelial A_{2A} de adenocarcinoma cervical humano (Hela-A_{2A}) que se prepararon en el laboratorio (Lote: A002/17-04-2018, concentración de proteína = 2058 μ g/ml), 3 nM [3H]- ZM241385 (50 Ci/mmol, 1 mCi/mL, ARC-ITISA 0884) y GD o estándar. Se determinó la unión no

específica en presencia de 5'-(N-etilcarboxamido) adenosina (NECA) 50 μM (Sigma E2387). La mezcla de reacción (Vt: 200 μL /pocillo) se incubó a 25°C durante 30 min, luego se filtró y se lavó cuatro veces con 250 μL de tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, MgCl_2 10 mM, pH = 7.4), antes de medir en un contador de centelleo beta de microplaca (MicrobetaTrilux, PerkinElmer, Madrid, España) (Fredholm *et al.*, 2001).

5.2.3.3 Receptores de adenosina A_{2B} :

Los experimentos de unión por competición del receptor de adenosina A_{2B} se llevaron a cabo en una placa de 96 pocillos GF/C (Millipore, Madrid, España). En cada pocillo se incubaron 25 μg de membranas de la línea celular Euroscreen de riñón embrionario humano- A_{2B} (HEK- A_{2B}) que se prepararon en el laboratorio (Lote: A008/30-04-2019, concentración de proteína = 3916.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 25 nM [3H]-DPCPX (137 Ci/mmol, 1 mCi/mL, Perkin Elmer NET974001MC) y GD o estándar. La unión no específica se determinó en presencia de NECA 1000 μM (Sigma E2397). La mezcla de reacción (Vt: 250 μL /pocillo) se incubó a 25°C durante 30 min, se transfirieron 200 μL a una placa de 96 pocillos GF/C (Millipore, Madrid, España) pretratada con tampón de unión (Tris-HCl 50 mM), EDTA 1 mM, MgCl_2 5 mM, Bacitracina 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, adenosina desaminasa 2 U/mL, pH = 6,5), luego se filtró y se lavó cuatro veces con 250 μL de tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, MgCl_2 5 mM, pH = 6,5), antes de medir en un contador de centelleo beta de microplaca (MicrobetaTrilux, PerkinElmer, Madrid, España) (Fredholm *et al.*, 2001).

5.2.3.4 Receptores de adenosina A_3 :

Los experimentos de unión por competición del receptor de adenosina A_3 se llevaron a cabo en una placa de 96 pocillos GF/B (Millipore, Madrid, España) pretratada con tampón de unión (Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, MgCl_2 5 mM, 2 U/mL 2 adenosina desaminasa, pH = 7,4). En cada pocillo se incubaron 30 μg de membranas de la línea celular Hela- A_3 que se prepararon en el laboratorio (Lote: A005/05-07-2019, concentración de proteína = 3925 $\mu\text{g}/\text{mL}$), [3H]-NECA 10 nM (26,3 Ci/mmol, 1 mCi/mL, Perkin Elmer NET811250UC) con GD y estándar. La unión no específica se determinó en presencia de R-PIA 100 μM (Sigma P4532). La mezcla de reacción (Vt: 200 μL /pocillo) se incubó a 25°C durante 180 min, luego se filtró y se lavó seis veces con 250 μL de tampón de lavado (Tris-HCl 50mM pH = 7.4),

antes de medir en una microplaca de centelleo beta contador (MicrobetaTrilux, PerkinElmer, Madrid, España) (Gao *et al.*, 2002).

5.3 ESTUDIOS *IN VIVO*

5.3.1 Animales

Para la realización de los experimentos se utilizaron ratones albinos machos “*Mus Musculus*” CF-1 o Charles River “CD1-Swiss” con 2-3 meses de edad y un peso de 25 ± 5 gramos. Los animales fueron suministrados por el Centro de Experimentación y Reproducción de Animales de Laboratorio (CREAL) de la UFRGS o por la Unidad de Producción Animal del Animalario Central de la USC.

Se ha realizado un estudio matemático previo (cálculo del tamaño muestral) para determinar el número de animales mínimo necesario para los estudios a realizar y la validez estadística de los mismos siguiendo el principio de las 3Rs (reemplazo, reducción, refinamiento). Para el cálculo se ha utilizado el programa G*Power (<http://www.gpower.hhu.de/>) y otras referencias (Rojo, 2014; Mayer *et al.*, 2017).

El número mínimo de animales utilizados en cada experimento fue de 8 (N=8-12) y el número total de animales utilizados en esta tesis fue de un máximo de 312.

Todos los protocolos experimentales realizados en la UFRGS y la USC se efectuaron de acuerdo con las legislaciones nacionales e internacionales (Directrices del Consejo Brasileño de Animales de Experimentación - CONCEA -, Directiva UE 2010/63/UE, RD 53/2013, Orden ECC/566/2015, RD 1386/2018, RD 118/2021), con la aprobación del Comité sobre el Uso Ético de los Animales de la UFRGS (número de autorización 32940), Xunta de Galicia Procedimientos Informados 15007AE/09/INV MED 02/NER 02/JAFG4, 15007AE/09/INV MED 02/NER 02/JAFG14, 15007AE/09/INV MED 02/NER 02/JAFG15, Proyecto 15012/2021/008.

Los ensayos *in vivo* se realizaron en los establecimientos autorizados: laboratorio de Neurofarmacología y Toxicología Pre-clínica (LABNET), asociado al animalario del Instituto de Ciencias Básicas de la Salud (ICBS), del Departamento de Farmacología de la UFRGS y laboratorio de Farmacología del Sistema Nervioso Central, asociado al Animalario de la Facultad de Farmacia (REGA ES150780263501), del Departamento de Farmacología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la USC.

Los ratones se estabularon en grupos de 4/5 animales en cajas de plástico con superficie basal de 600 cm² (300x 200x 130 mm) sobre un suelo de virutas de madera, con agua y comida *ad libitum*.

Previamente a la realización de los experimentos los animales se aclimataron a las condiciones ambientales, durante un mínimo de 72 horas, en una sala con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h (luces encendidas a las 07:00 h), con una temperatura constante de 23 ± 2°C y con control de la humedad ambiental (45 – 65%).

Todos los experimentos se realizaron en una habitación aislada a la misma hora del día (entre las 08:00 y las 14:00 h), para evitar posibles variaciones provocadas por los ritmos circadianos. Todos los procedimientos de manipulación de animales se llevaron a cabo manteniendo el bienestar de los mismos a fin de minimizar el potencial estrés ocasionado por los experimentos.

5.3.2 Evaluación del efecto anticonvulsivo de la gamma-decanolactona

5.3.2.1 Fármacos y reactivos

Los fármacos y reactivos utilizados en los experimentos fueron PTZ, AMINOPH, bicuculina, 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina (DPCPX), 4-(2-[7-amino-2-(2-furyl[1,2,4]-triazolo[2,3-a[1,3,5]triazin-5-yl-aminoethyl)phenol (ZM 241385), GD, Tween (TW) 80, dimetilsulfóxido (DMSO) y cloruro de sodio (NaCl) suministrados por Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Missouri, EE. UU.). El diazepam (DZP; Compaz), suministrado por Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltd. (São Paulo, Brasil). La GD, los fármacos de referencia y los vehículos se administraron por vía intraperitoneal (i.p.) con excepción del PTZ, que se administró por vía subcutánea (s.c.). El volumen de administración fue de 10 ml/kg de peso corporal.

El NaCl se preparó en solución al 0.9% (p/v) con agua Milli-Q en agitación, para obtener la solución salina (SAL). El PTZ (43 mg/kg), la AMINOPH (280 mg/kg), la bicuculina (2 mg/kg), el ZM 241385 (3 mg/kg) y el DZP (2 mg/kg) se disolvieron en SAL.

La GD (300 mg/kg) se disolvió en TW 5% y el DPCPX (2 mg/kg) se disolvió en DMSO 5%, ambos con agitación constante.

Las dosis de fármaco se eligieron en base a estudios previos de otros investigadores en roedores y/o en base a estudios preliminares realizados por nosotros mismos (Hansen *et al.*, 2004; Siebel *et al.*, 2015; Pflüger *et al.*, 2018b).

5.3.2.2 Diseño experimental

5.3.2.2.1. Protocolo farmacológico de crisis epilépticas agudas

El protocolo de crisis epilépticas agudas inducidas por AMINOPH se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito por Jaishree *et al.* (2003), con ligeras modificaciones.

Los animales se asignaron al azar a siete grupos de tratamiento diferentes, como se describe a continuación:

Grupo 1. SAL + SAL + AMINOPH

Grupo 2. SAL + TW + AMINOPH

Grupo 3. SAL + DMSO + AMINOPH

Grupo 4. SAL + DZP + AMINOPH

Grupo 5. SAL + GD + AMINOPH

Grupo 6. DPCPX + GD + AMINOPH

Grupo 7. ZM241385 + GD + AMINOPH

En el tiempo 0 min se les administró la SAL o DPCPX o ZM 241385 a los animales. Transcurridos 15 min se le administraron los tratamientos asignados a cada grupo (SAL, TW, DMSO, DZP o GD). Transcurridos 30 min más desde el segundo tratamiento de cada animal (tiempo total 45 min) se les administró el fármaco proconvulsivo AMINOPH, conforme se muestra en el esquema de diseño experimental (Figura 20).

Inmediatamente después de la inyección de la AMINOPH, los ratones se colocaron individualmente en cajas acrílicas transparentes. La observación del comportamiento y aparición de crisis se realizó durante los siguientes sesenta minutos cronometrados.



Crisis epiléptica aguda – modelo de AMINOPH

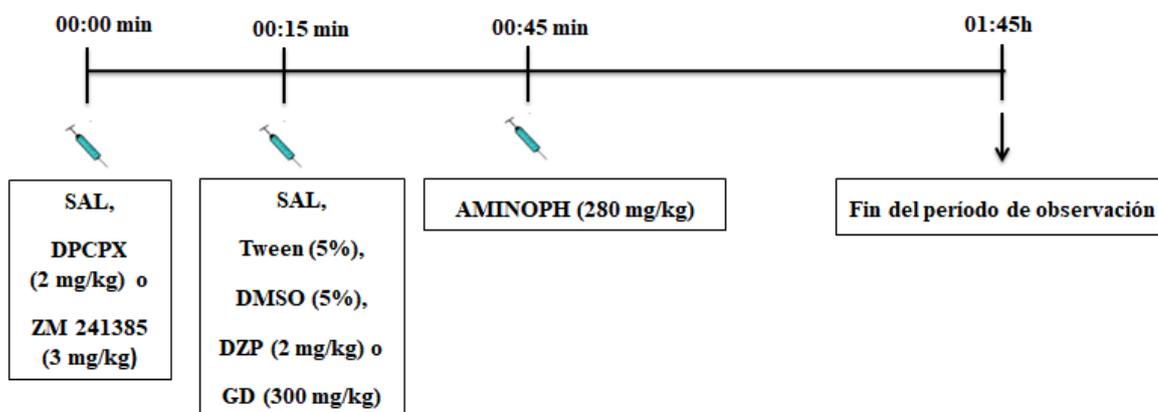


Figura 20: Línea del tiempo que representa el diseño experimental y los distintos tratamientos administrados.

La aparición de las crisis tónico-clónicas que duraron más de 3s y la latencia de aparición de la primera crisis fueron los parámetros evaluados.

La dosis de AMINOPH utilizada en este estudio fue elegida en una prueba piloto inicial. Su acción proconvulsiva puede estar relacionada con la capacidad de antagonizar los receptores de adenosina A_1 o bien puede ser debida a la inhibición de la actividad de la enzima fosfodiesterasa-3, causando una hiperexcitabilidad neuronal (Ya'u *et al.*, 2015).

El DZP, un agonista de los receptores benzodiazepínicos que intensifica la acción del GABA en los receptores $GABA_A$, fue utilizado en este ensayo como control positivo y su dosis también fue elegida por estudios previos (Jaishree *et al.*, 2003). SAL, TW y DMSO fueron utilizados en este ensayo como control negativo.

El DPCPX, un antagonista del receptor de adenosina A_1 y el ZM 241385 un antagonista del receptor de adenosina A_{2A} , se utilizaron para estudiar la posible actuación de la GD en el sistema purinérgico. Sus dosis también fueron elegidas en base a estudios previos (Southam *et al.*, 2002; Mares, 2010; Siebel *et al.*, 2015).

5.3.2.2.2. Protocolo farmacológico de crisis epilépticas subcrónicas (Kindling)

Aunque previamente la GD fue evaluada en este mismo modelo de *Kindling* por de Oliveira *et al.*, (2008), quien puso de manifiesto que la GD era capaz de proteger contra las

crisis subcrónicas inducidas por PTZ, en esta tesis se utilizó este el modelo con el objetivo de evaluar los posibles mecanismos de acción de la GD como fármaco anticonvulsivo.

Para hacerlo posible, además de utilizar el protocolo descrito por de Oliveira *et al.*, (2008), también utilizamos un antagonista del receptor GABA_A, la bicuculina, dos antagonistas del receptor de adenosina A₁ y A_{2A}, el DPCPX y el ZM 241385, respectivamente, para estudiar la posible actuación de la GD en los sistemas GABAérgico y/o purinérgico (Southam *et al.*, 2002; Hansen *et al.*, 2004; Mares, 2010; Siebel *et al.*, 2015).

Los animales se asignaron al azar a ocho grupos de tratamiento diferentes como se describe a continuación:

Grupo 1. SAL + SAL + SAL

Grupo 2. SAL + SAL+ PTZ

Grupo 3. SAL + TW + PTZ

Grupo 4. SAL + DZP + PTZ

Grupo 5. SAL + GD + PTZ

Grupo 6. BIC + GD + PTZ

Grupo 7. DPCPX + GD + PTZ

Grupo 8. ZM241385 + GD + PTZ

El primer grupo de animales recibieron solo SAL (tres inyecciones) como control del ensayo posterior de *Western blotting*.

Los grupos dos y tres fueran utilizados como controles negativos y el grupo cuatro, DZP se utilizó como control positivo.

El PTZ que actúa uniéndose al sitio de la PCT del receptor GABA_A, inhibiendo el funcionamiento de los canales de cloruro, fue utilizado en una dosis subconvulsiva (43 mg/kg s.c.) obtenida mediante una prueba piloto previa.

El protocolo se llevó a cabo con la administración de PTZ cada tres días, totalizando seis tratamientos (16 días). Los animales recibieron SAL, TW 5%, DZP (2 mg/kg) o GD (300 mg/kg), 30 min antes de cada inyección de PTZ.

Como se indicó anteriormente, para evaluar el mecanismo de acción de la GD en el modelo *Kindling*, en el último día del protocolo, quince minutos antes del tratamiento con la GD y 45 min antes de la administración de la última dosis de PTZ, los animales del grupo seis

recibieron bicuculina (2 mg/kg), los animales del grupo siete recibieron DPCPX (2 mg/kg) y los del grupo ocho recibieron ZM 241385 (3 mg/kg). En la figura 21, se muestra un diagrama del diseño experimental.

Inmediatamente después de cada inyección de PTZ, los ratones se colocaron individualmente en cajas acrílicas transparentes. La observación del comportamiento y de la aparición de crisis se realizó durante treinta minutos cronometrados.

La gravedad de las crisis se cuantificó utilizando la escala de Racine (Racine, 1972), adaptada por da Silva *et al.*, (1998).

- 0: sin comportamiento convulsivo;
- 1: espasmos mioclónicos;
- 2: crisis clónica bilateral de la extremidad anterior que dura menos de 3 s;
- 3: crisis clónica bilateral de la extremidad anterior que dura más de 3 s;
- 4: crisis tónico-clónica;
- 5: muerte.

La aparición de crisis clónicas de las extremidades anteriores que duraron más de 3s y la latencia de la primera crisis fueron los parámetros evaluados en cada día de administración de PTZ. Para la comparación entre grupos, se eligió el estadio 3 de la escala de Racine para permitir una evaluación más clara y precisa del comportamiento del animal.

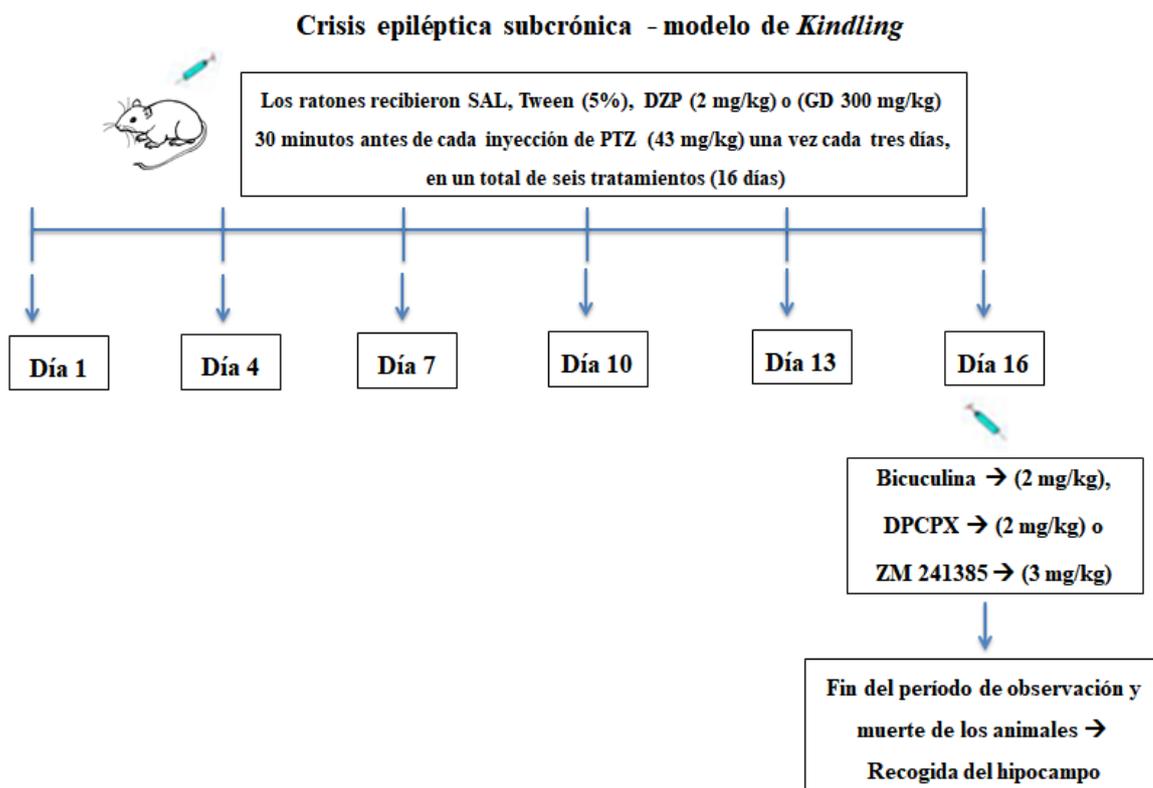


Figura 21: Línea del tiempo que representa el diseño experimental y los distintos tratamientos.

Después de completar el protocolo, todos los animales fueron decapitados.

5.3.2.3 Eutanasia y recogida de los tejidos

La eutanasia de los animales se llevó a cabo de acuerdo con la Resolución N°. 37/2018 - Directriz de práctica de eutanasia del Consejo Nacional para el Control de Experimentación Animal. El procedimiento se realizó en una habitación separada, en un ambiente tranquilo y limpio, utilizando una guillotina.

Se recolectaron muestras de hipocampo derecho e izquierdo según la técnica descrita por Siqueira *et al.*, (2007) y Regner *et al.*, (2020), con ligeras modificaciones. Las muestras se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido en *ependorf* identificado y luego se almacenaron a una temperatura de -80 °C.

5.3.2.4 Expresión de los resultados, análisis estadístico y representación gráfica

Se aplicó el test exacto de Fisher para analizar los porcentajes de crisis epilépticas. Los datos de latencia se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba

de Dunn ($p \leq 0,05$). Los resultados se expresaron como media \pm error estándar de la media (e.e.m.). Los datos se analizaron utilizando el programa GraphPad Prism v.5.0 (GraphPad Software, Inc. San Diego, California, EE. UU.).

5.3.3. Evaluación del efecto antiparkinsoniano de la gamma-decanolactona

5.3.3.1 Fármacos y reactivos

Los fármacos y reactivos utilizados en los experimentos fueron reserpina, LD, benserazida (BZ), GD, TW 80, y el ácido acético glacial (CH_3COOH) suministrados por Sigma-Aldrich (S.A.) (St. Louis, Missouri, EE. UU.). La carboximetilcelulosa sódica (CMCNa), suministrada por Merck (Madrid, España). Todos los fármacos o reactivos se administraron por vía intraperitoneal (i.p.) en un volumen de 10 ml/kg de peso corporal.

La CMCNa se preparó en suspensión al 1% (p/v) con agua Milli-Q (Millipore Ibérica S.A., Madrid, España) en agitación constante durante un mínimo de 2 horas. La reserpina (1,5 mg/kg) se disolvió en solución de agua con ácido acético ($\text{H}_2\text{O} + \text{CH}_3\text{COOH}$ 0,1%). Tanto la LD (100 mg/kg) como la BZ (25 mg/kg) se suspendieron en CMCNa 1% (p/v). La GD (300 mg/kg) se disolvió en TW 5%.

Las dosis de los fármacos se eligieron en base a estudios realizados previamente (Matos *et al.*, 2013; Pfluger *et al.*, 2018a).

5.3.3.2 Protocolo farmacológico y diseño experimental

Los animales se asignaron al azar a seis grupos de tratamiento diferentes. Este protocolo implica la administración de reserpina (1,5 mg/kg) o vehículo ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOH}$ 0,1%) a los animales, 18 h antes del inicio de cada ensayo. La segunda administración ocurrió 1:30 h antes del inicio del ensayo con la GD (300 mg/kg) o el vehículo (TW 5%) y 30 min después, se realizó la última administración de la LD+BZ (100:25 mg/kg) o el vehículo (CMCNa 1%). Sesenta minutos después de la última administración, se evaluaron la coordinación motora, la modificación de la temperatura corporal y la actividad locomotora, como se describe a continuación. En la figura 22 se muestra un diagrama con el diseño experimental.

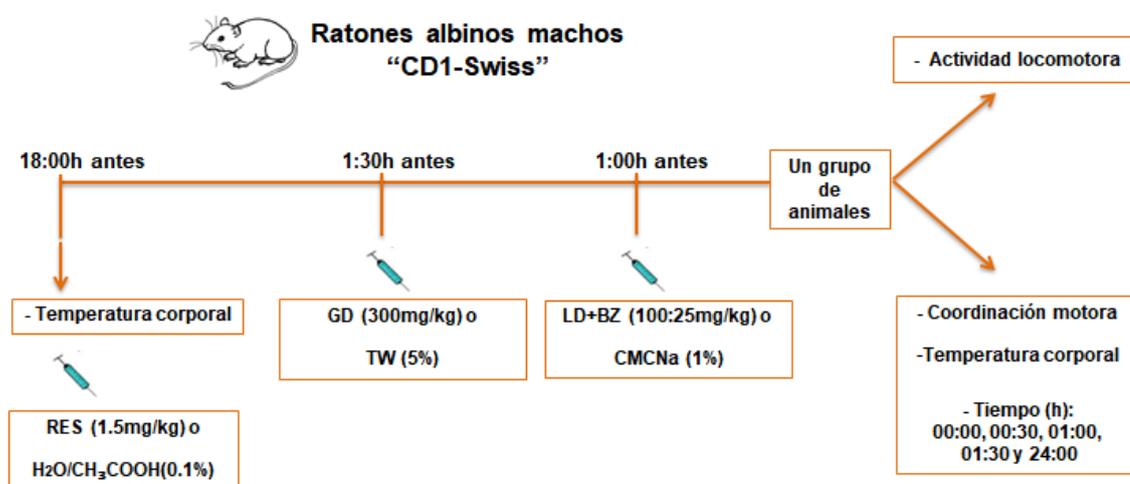


Figura 22: Línea de tiempo que representa el diseño experimental y los distintos tratamientos.

5.3.3.2.1 Ensayo de la coordinación motora - Rota-rod test

La coordinación motora de los animales se evaluó siguiendo la técnica descrita por Dunham y Miya (1957), con ligeras modificaciones. Los ratones fueron entrenados inicialmente durante 3 días para evaluar su capacidad de mantener el equilibrio en una barra giratoria de 3cm de diámetro que gira a una velocidad constante de 16 rpm, durante 180 segundos (s). Se utilizó un equipo Rotamex 4/8 (Columbus Instruments, OH, EE. UU.).

Los ratones capaces de permanecer en la barra caminando durante los 180s fueron seleccionados y clasificados en seis grupos de cuatro ratones cada uno. Los animales asignados a cada grupo experimental recibieron los tratamientos mencionados anteriormente.

Sesenta minutos después del último tratamiento con LD+BZ o CMCNa (al tiempo 0) cada ratón se colocó en el *Rota-rod* (Figura 23) para evaluar el tiempo de permanencia en la barra giratoria y el porcentaje de animales que fallaron (el tiempo de corte fue de 180 s). Se realizaron mediciones cada 30 min durante la primera hora y media (00:00, 00:30, 01:00, 01:30 h) y, finalmente a las 24:00 h de la última administración.



Figura 23: Rota-rod Columbus Instruments.

5.3.3.2.2 *Modificación de la temperatura corporal*

La temperatura rectal de cada ratón se midió a las -18:00 h (temperatura basal antes de la administración de reserpina) y en los tiempos 00:00, 00:30, 01:00, 01:30 y 24:00 h después del último tratamiento (LD+BZ o CMCNa) de cada grupo utilizando un termómetro modelo 0331 (PanLab Instruments, Barcelona, España) (Figura 24).



Figura 24: Termómetro PanLab Instruments modelo 0331.

5.3.3.2.3 Test de actividad locomotora - Open Field Test (OFT)

La evaluación de la actividad locomotora en ratones se realizó mediante el test de campo abierto, siguiendo la técnica descrita por Rodríguez-Enríquez *et al.*, (2020), con ligeras modificaciones. Sesenta minutos después del último tratamiento con LD+BZ o CMCNa, se dispuso a los animales de cada grupo en una caja cuadrada negra de tamaño ($100 \times 100 \times 30 \text{ cm}^3$), que, a su vez, está subdividida en 4 arenas independientes de dimensiones ($50 \times 50 \times 30 \text{ cm}^3$) en las que se colocan cada uno de los ratones de forma independiente.

La observación de los animales se realizó desde una habitación adyacente a la de realización del experimento utilizando para ello un sistema de video-registro. La actividad de los animales se captó con una videocámara analógica (Sony DXC-107AP, Sony Corporation, Japón) suspendida en el techo. La cámara está conectada a un adaptador (Sony CMA- D2CE) que envía la señal a un monitor (Sony PVM-14M2E) y a dos tarjetas digitalizadoras:

1. Una interna localizada en una ranura PCI del ordenador (Picolo frame grabber, Euresys, Lieja, Bélgica).
2. Otra externa con conexión USB (DVC-USB, Dazzle-Pinnacle, ON, Canadá).

La señal directa de la tarjeta Pico es utilizada por el sistema videocomputerizado de observación animal (EthoVision V. 3.1.16, Noldus Information Technology, Wageningen, Holanda).

El software EthoVision localiza el centro del animal, simbolizado gráficamente por la intersección entre los ejes de coordenadas (x, y), almacena los datos y permite el análisis posterior (Figura 25).

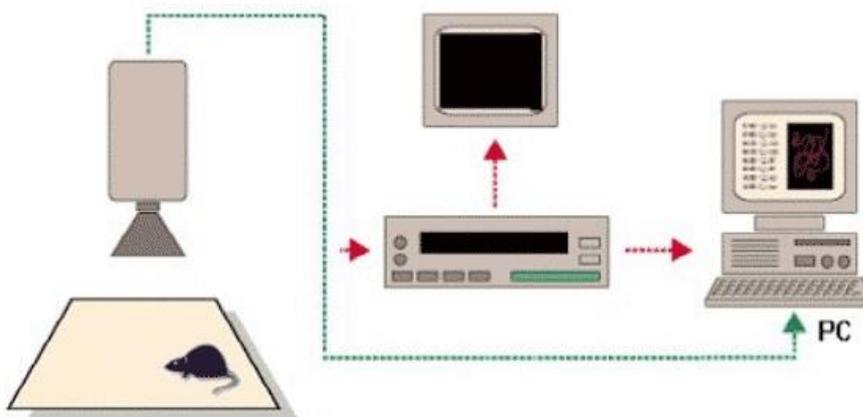


Figura 25. Esquema del equipo utilizado en el OFT.

Todos los ensayos, de una hora de duración, fueron grabados digitalmente mediante la tarjeta DVC-USB y el Dazzle MovieStar software (V.4.5) que graba el vídeo *in vivo* del experimento y permite el análisis de comportamientos no susceptibles de automatización.

En cada ensayo se evaluaron los siguientes parámetros:

- Distancia recorrida (cm/h);
- Velocidad media (cm/s);
- Frecuencia de enderezamientos (n°).

5.3.3.3 Expresión de los resultados, análisis estadístico y representación gráfica

Los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media (e.e.m.). La representación gráfica y el análisis estadístico se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism v.5.0 (GraphPad Software, Inc. San Diego, California, EE. UU.). Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante el test ANOVA de dos vías (tratamiento-tiempo) seguida del test de Bonferroni. Se aplicó el test exacto de Fisher para

analizar los porcentajes de animales que fallaron en el ensayo de *Rota-rod*. Se determinaron diferencias estadísticamente significativas con $p \leq 0.05$.

5.4 ESTUDIO *EX VIVO*

5.4.1 Reactivos

Los anticuerpos primarios de los receptores anti-GABA_A $\alpha 1$ y anti-adenosina A₁ fueron suministrados por Abcam[®], n° de catálogo ab33299 y ab151523 respectivamente (Cambridge, Inglaterra). El normalizador anti- β -actina fue suministrado por Cell Signaling Technology[®], n° de catálogo 8457 (Danvers, Massachusetts, EE. UU.). El anticuerpo secundario ligado a peroxidasa de cabra anti-conejo fue suministrado por EMD Millipore (Merck[®]) (Billerica, Massachusetts, EE. UU.). El marcador de peso molecular Precision Plus Protein[®] Dual Color, las membranas de polifluoruro de vinilideno y el reactivo de Bradford fueron suministradas por BioRad (Hercules, California, EE. UU.). El kit *enhanced chemiluminescence Prime Western blotting detection reagent* y la película fotográfica *Hyperfilm[®] enhanced chemiluminescence* fueron suministrados por GE Healthcare (Chicago, Illinois, EE. UU.). Los demás reactivos utilizados en el ensayo de *Western blotting* fueron suministrados por Sigma Aldrich (S.A.) (St. Louis, Missouri, EE. UU.).

5.4.2 Preparación de la muestra

Las muestras de hipocampo congeladas de cada animal se homogeneizaron en *potter* con solución tampón de lisis (pH 7,4) que contenía inhibidores de proteasa y detergentes (NaCl 150 mM, hidrocloreuro de hidroximetil-amino-metano (Tris-HCl) 20 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM, glicerol al 10%, Nonidet P40 (NP 40) al 1% y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0,2 mM). La homogeneización se realizó 10 veces suavemente para cada muestra, manteniéndose siempre en hielo. La suspensión se centrifugó a 7000 xg durante 10 min a 4°C para descartar los restos celulares, y la fracción sobrenadante obtenida se utilizó para el ensayo de *Western blotting*. Los niveles de proteína se midieron mediante el método colorimétrico descrito por Bradford, (1976), utilizando albúmina de suero bovino (BSA) (1 mg/ml) como estándar.

5.4.3 Ensayo de *Western blotting*

Para realizar el ensayo de Western se separó una muestra de 30 µg de proteínas totales mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12%. La electroforesis se llevó a cabo durante 2 h a 70-120 V, en tampón (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0,1%). Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno que fueron previamente activadas en metanol y se sumergieron en tampón de transferencia (metanol 15% (v/v), Tris 25 mM, glicina 192 mM a pH 8,3) durante al menos 10 min. La transferencia duró 60 min a 100 V.

Las membranas se bloquearon mediante incubación en BSA al 1% (p/v) y TBS (Tris-HCl 20 mM, NaCl 140 mM, pH = 7,4) suplementada con TW 20 al 0,1 % (v/v) (TBS-T) durante 30 min a temperatura ambiente en agitación y luego se lavaron con tampón TBS-T. A continuación, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios durante aproximadamente 16 h con agitación a 4 °C. Los anticuerpos primarios utilizados fueron policlonales de conejo para la subunidad α_1 del receptor anti-GABA_A (52 kDa; 1:500), receptor anti-adenosina A₁ (37 kDa; 1:500) y anti- β -actina (45 kDa; 1:500). Después de la incubación del anticuerpo primario, las membranas se lavaron tres veces en tampón TBS-T y se hibridó el anticuerpo secundario ligado a peroxidasa de cabra anti-conejo (Dilución 1:10.000) durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación. Pasadas las 2 horas, las membranas se lavaron con TBS 3 veces durante 10 min y se procedió al revelado de las mismas. El revelado se llevó a cabo por quimioluminiscencia seguida de la superposición de las membranas a películas autorradiográficas (Hyperfilm ECL, Amersham) (Chicago, Illinois, EE. UU.). El análisis densitométrico se realizó con el software Image J (NIH, Bethesda, Maryland, EE. UU.).

5.4.4 Expresión de los resultados, análisis estadístico y representación gráfica

Los datos del *Western blotting* se analizaron mediante el test ANOVA de una vía, seguido del test de Dunnett con $p \leq 0,05$ considerado estadísticamente significativo. Los datos se analizaron utilizando el programa GraphPad Prism v.5.0 (GraphPad Software, Inc. San Diego, California, EE. UU.). Los experimentos con homogeneizados se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como media \pm error estándar de la media (e.e.m.).

RESULTADOS

6 RESULTADOS

En este capítulo se reproducen contenidos de la publicación de la doctoranda en la revista Behavioural Pharmacology. Editorial: Wolters Kluwer Health, Inc. ISSN: 0955-8810.

Pflüger P, Regner GG, Luft JG, Gonçalves DA, Krebs C, Fontenla JA, Pereira P. Gamma-decanolactone attenuates acute and chronic seizures in mice: a possible role of adenosine A₁ receptors. *Behav Pharmacol.* 2020 Sep;31(6):544-552. doi: 10.1097/FBP.0000000000000554.

Autoría: Pricila Pflüger^{a,b}

Coautoría: Gabriela Gregory Regner^a, Jordana Griebler Luft^a, Débora Aguirre Gonçalves^a, Chris Krebs^a, José Angel Fontenla^b, Patrícia Pereira^a.

Filiación: ^aDepartamento de Farmacología, Laboratorio de Neurofarmacología y Toxicología Preclínica, Instituto de Ciencias Básicas de la Salud, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. ^bDepartamento de Farmacología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España.

6.1 ESTUDIOS COMPUTACIONALES (*IN SILICO*)

6.1.1 Predicción de propiedades fisicoquímicas

Los valores obtenidos con la GD en los estudios computacionales, como la lipofilicidad expresada en miLogP, el peso molecular (MW), el área de superficie polar topológica (TPSA), el número de donantes de hidrógeno (nON), el número de aceptores de enlaces de hidrógeno (nOHNH), el volumen molecular (MV) y los enlaces rotativos (Nrotb) se presentan en tabla 2.

Es importante resaltar que la GD tiene valores de miLogP compatibles con los requeridos para cruzar las membranas. Los valores de miLogP en el rango de -0,4 a +5,6 son aceptables y la GD mostró un valor en este rango (milogP = 2.12).

El TPSA, descrito como un indicador predictivo de la capacidad de paso de las membranas, es positivo para la GD (TPSA = 26.30) aunque tiene un valor mucho más alto que los fármacos de referencia selegilina (TPSA = 3.24) y rasagilina (TPSA = 12.03), pero más bajo que el obtenido con la safinamida (TPSA = 64.36) (Ertl *et al.*, 2000).

El peso molecular (MW) de la GD (170.25) es el más bajo de todos los fármacos evaluados. Por el contrario, el peso molecular más alto correspondió a la safinamida (302.25). Los resultados obtenidos con los demás fármacos evaluados se encuentran entre los dos fármacos mencionados, con valores de 171.24 y 187.29 para rasagilina y selegilina, respectivamente.

Los resultados obtenidos para la predicción de aceptores de enlace de Hidrogeno (nOHNH), muestran que el valor obtenido con la GD fue de 2, y este valor es el doble que el obtenido con la selegilina (1) o la rasagilina (1), pero es la mitad que el obtenido con la safinamida (4).

En los donantes de enlace de Hidrogeno (nON) los resultados para la GD y la selegilina fueron idénticos (0), el valor de la rasagilina fue de 1 y para la safinamida, nuevamente se obtuvo el valor más alto (3).

El volumen molecular (MV) de la GD (180.76) fue ligeramente superior al obtenido con la rasagilina (175.10) pero inferior al obtenido con la selegilina (202.64) o la safinamida (279.04).

Las moléculas de mayor flexibilidad fueron la safinamida, con siete enlaces rotativos (Nrotb) y la GD con cinco enlaces rotativos, respectivamente. La mayor rigidez fue observada con la rasagilina, con dos enlaces rotativos, y la selegilina con cuatro enlaces rotativos. La flexibilidad molecular es un buen indicador de la biodisponibilidad oral de los fármacos (Veber *et al.*, 2002).

Además, se puede observar que ni la GD ni ninguna de las moléculas de referencia violan la regla de los cinco de Lipinski (Lipinski *et al.*, 2001), llamada así porque los valores límite de referencia son cinco o un múltiplo de cinco. La GD tiene un miLogP <5, el peso molecular <500, el número de aceptores de enlaces de H <10 y el número de donantes de enlaces de H <5. Con estos resultados, la GD exhibe propiedades fisicoquímicas adecuadas para convertirse en un buen fármaco.

Tabla 2: Propiedades fisicoquímicas de la GD y los fármacos de referencia IMAO-B

Compuesto	miLogP ^a	MW ^b	TPSA ^c	H-bond acceptors ^d	H-bond donors ^d	MV ^e	Nrotb ^f	Lipinski's ^g
GD	2.12	170.25	26.30	2	0	180.76	5	0
Selegilina	2.64	187.29	3.24	1	0	202.64	4	0
Rasagilina	2.10	171.24	12.03	1	1	175.10	2	0
Safinamida	2.91	302.35	64.36	4	3	279.04	7	0

Tabla 2: ^amiLogP - expresado como el logaritmo del coeficiente de partición octanol/agua. ^bMW - peso molecular. ^cTPSA - área de superficie polar topológica. ^dNúmero de aceptores de enlaces de H (nON) y donantes (nOHNH). ^eMV- volumen molecular. ^fNrotb - número de enlaces rotativos. ^gLipinski: número de infracciones.

6.1.2 Predicción de la capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica

Las propiedades de cruce de la BHE para la GD y los fármacos estándar de referencia IMAO-B, selegilina, rasagilina y safinamida, se evaluaron utilizando el programa “*CBligand-BBB predictor*” con dos algoritmos, AdaBoost y *support vector machine* (SVM), con cuatro huellas dactilares: MACCS, Open Babel (FP2), Molprint 2D y PubChem. Los resultados obtenidos muestran que la GD y los fármacos de referencia tienen valores compatibles con los requeridos para cruzar la BHE como se muestra en la tabla 3.

Los resultados obtenidos con el algoritmo Adaboost fueron similares, en todas las huellas dactilares, para la GD y los dos inhibidores clásicos de la MAO-B, selegilina y rasagilina, con valores > 7, excepto en el algoritmo Molprint 2D, donde la GD exhibió un valor muy bajo (2.931). Por el contrario, el inhibidor de la MAO-B comercializado más recientemente, la safinamida, muestra un valor muy bajo en tres de las cuatro huellas dactilares examinadas excepto, en contraste con la GD, en el valor de la huella dactilar 2D de Molprint, donde tiene un valor máximo de 10.783.

Cabe destacar el valor negativo obtenido con la safinamida con la huella de PubChem, en cualquier caso, los valores obtenidos con la GD con este algoritmo predicen su capacidad para atravesar la BHE.

A diferencia del algoritmo anterior, en el algoritmo SVM, los valores de la GD y de los fármacos de referencia son más similares y en todos los casos, con valores positivos que predicen su capacidad para cruzar la BHE.

Tabla 3 (A y B) Predicción para cruzar la barrera hematoencefálica (BHE)

(A)	Algoritmo AdaBoost			
	Huella dactilar			
Compuesto	MAC CS	Open Babel (FP2)	Molprint 2D	PubChem
GD	7.036	11.288	2.931	10.225
Selegilina	7.464	10.964	8.447	9.465
Rasagilina	8.614	10.405	7.428	10.997
Safinamida	3.128	5.454	10.783	-1.037

(B)	Algoritmo SVM			
	Huella dactilar			
Compuesto	MAC CS	Open Babel (FP2)	Molprint 2D	PubChem
GD	0.052	0.212	0.314	0.465
Selegilina	0.110	0.138	0.347	0.239
Rasagilina	0.090	0.216	0.330	0.331
Safinamida	0.067	0.143	0.465	0.127

Tablas 3 A y B: Algoritmos AdaBoost y SVM: la puntuación para cruzar la BHE (BHE +) o no cruzar (BHE -) es 0, excepto para SVM MACCS que es 0.02. Escala AdaBoost: MACCS (-15.00 - +15.00), Openbabel (FP2) (-40.00 - +40.00), Molprint 2D (-20.00 - +20.00), PubChem (-30.00 - +30.00). Escala SVM: MACCS (-0.80- +0.50), Openbabel (FP2) (-2.00 - +2.00), Molprint 2D (-1.00 - +2.00), PubChem (-2.00 - +1.00).

6.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTICONVULSIVO DE LA GAMMA-DECANOLACTONA

6.2.1 Modelo agudo de crisis epilépticas

En este modelo, evaluamos los efectos anticonvulsivos de la GD en crisis agudas inducidas por la AMINOPH. Además, investigamos el efecto de la GD en combinación con dos antagonistas de receptores de adenosina A₁ (DPCPX) y A_{2A} (ZM 241385) con el fin de comprender si en el mecanismo de acción de la GD está involucrado el sistema purinérgico.

Las figuras 26a y 26b muestran los efectos de la GD sobre las crisis inducidas por AMINOPH en ratones. La prueba estadística de Kruskal-Wallis mostró que la latencia hasta la primera crisis tónico-clónica inducida por AMINOPH fue diferente entre los grupos de tratamiento ($H(6) = 27,90, p \leq 0.001$; Figura 26a).

Todos los ratones del grupo de control SAL tuvieron crisis tónico-clónicas de una duración superior a 3s, lo que demuestra que la prueba tiene validez predictiva (Figura 26b).

El DZP, un agonista de los receptores benzodiazepínicos, que intensifica la acción del GABA sobre los receptores GABA_A, aumentó la latencia para la primera crisis ($p \leq 0.001$) y disminuyó el porcentaje de crisis ($p \leq 0.001$) en comparación con el grupo SAL. El grupo que recibió TW y DMSO no mostró diferencias estadísticamente significativas en ningún parámetro en comparación con el grupo control (SAL), mostrando así que no son capaces de interferir en la acción de la GD.

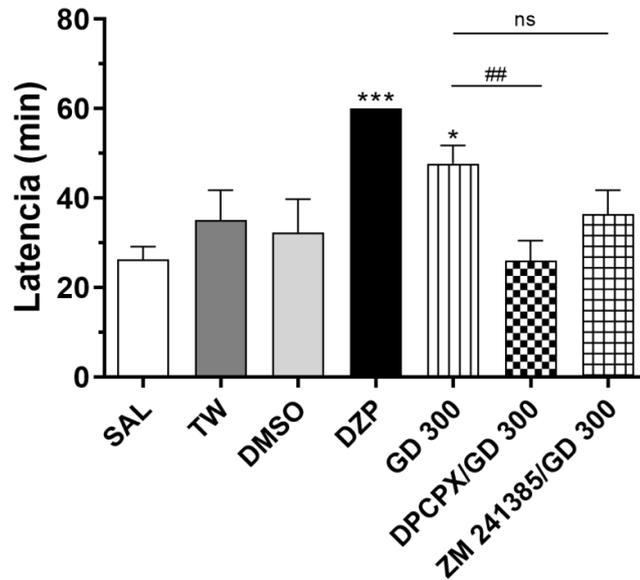
Los animales tratados con la GD (300 mg/kg) tuvieron un aumento significativo en la latencia de aparición de la primera crisis ($p \leq 0.05$) y una disminución en el porcentaje de crisis en comparación con el grupo de control ($p \leq 0.01$), confirmando su actividad en este modelo de estudio.

Cuando comparamos los resultados del grupo tratado solo con la GD con el grupo tratado con la GD en combinación con DPCPX, observamos que hay una diferencia estadísticamente significativa, es decir, el antagonista de receptor de adenosina A₁ revirtió la protección producida por la GD, tanto en la latencia de aparición de la primera crisis como en el porcentaje de crisis, como se puede observar en las figuras 26a y 26b, con valores de $p \leq 0.01$ y $p \leq 0.05$, respectivamente.

Por otro lado, al comparar el grupo de la GD con el grupo tratado con la GD en combinación con el ZM 241385, se observó que no había diferencia estadísticamente significativa. Así, el antagonista del receptor de adenosina A_{2A} no ha podido modificar los efectos de GD en la latencia de aparición de la primera crisis ($p = 0.99$) y en el porcentaje de crisis ($p = 0.17$).

Estos resultados en conjunto ponen de manifiesto que el efecto de la GD puede ser debido a su interacción con los receptores de adenosina A₁, pero no con los receptores de adenosina A_{2A}.

(a)



(b)

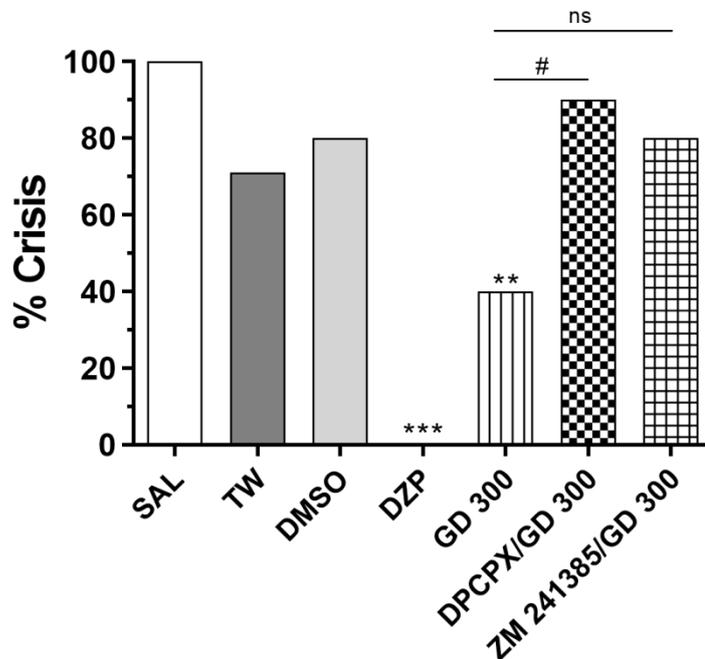


Figura 26: Efecto de la GD (300 mg/kg) sobre las crisis inducidas por AMINOPH en ratones N=10 animales por grupo. (a) Latencia hasta la primera crisis tónico-clónica que dura más de 3s; (b) porcentaje de crisis

tónico-clónicas que duran más de 3s. Los valores representan la media \pm error estándar de la media (e.e.m.). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$ vs. el grupo SAL. # $p \leq 0.05$ y ## $p \leq 0.01$ vs. el grupo GD 300.

6.2.2 Crisis epilépticas subcrónicas (*Kindling*)

En este modelo de *Kindling* evaluamos los efectos anticonvulsivos de la GD en crisis subcrónicas inducidas por el PTZ. Además, investigamos el efecto de la GD administrada en combinación con un antagonista del receptor GABA_A (bicuculina) y dos antagonistas de receptores de adenosina A₁ (DPCPX) y A_{2A} (ZM 241385) con el fin de averiguar si en este caso, en el mecanismo de acción de la GD están involucrados los sistemas GABAérgico y purinérgico.

Como se puede observar en la figura 27 en el grupo SAL/PTZ, solo el 11.11% de los animales presentaron crisis clónicas de las extremidades anteriores que duraron más de 3s en el primer día de tratamiento. Sin embargo, después del último día de tratamiento, el 100% de los animales de este grupo tuvieron crisis superiores a 3s, mostrando una diferencia estadísticamente significativa con respecto al primer día de tratamiento ($p \leq 0.001$). Estos resultados confirman que la dosis de PTZ subconvulsiva utilizada (43 mg/kg, s.c.) indujo un estado de epileptogénesis (estado de *Kindling*) en los ratones después de seis tratamientos.

Al observar el efecto de la GD (300 mg/kg) en este modelo *Kindling* (Figura 27), al igual que en el estudio anterior hecho por de Oliveira *et al.*, (2008), la GD pudo bloquear las crisis inducidas por administraciones repetidas de PTZ ($p \leq 0.001$), aunque la dosis del fármaco pro-convulsivante (PTZ) utilizada en este caso es diferente de la utilizada por de Oliveira *et al.*, (2008).

El DZP (2 mg/kg), utilizado como control positivo, también fue eficaz ($p \leq 0.001$ vs. el grupo SAL). El grupo TW mostró respuestas similares a las observadas en el grupo SAL.

Además, analizando los datos de los grupos de la GD y el DZP, se observó que no hubo diferencia estadísticamente significativa entre el primer y el último día de tratamiento, lo que confirma el efecto protector de estos dos compuestos en este modelo de crisis (Figura 27).

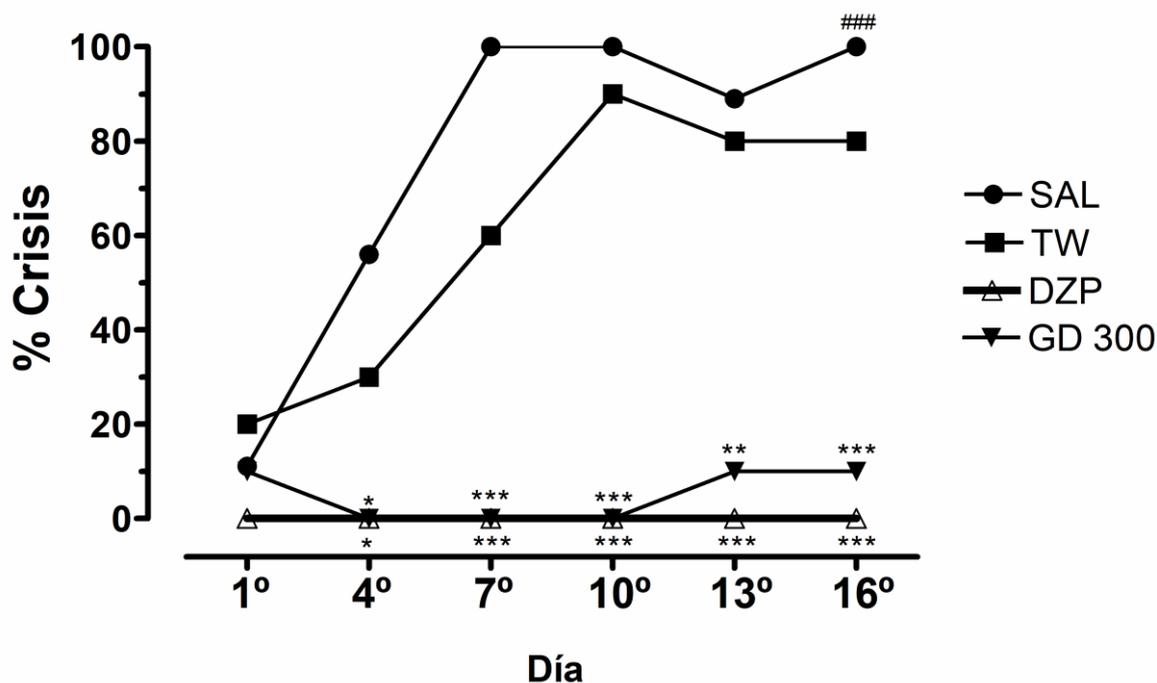


Figura 27: Efecto de la GD (300 mg/kg) en el modelo *Kindling*, N=10 animales por grupo. Se contabilizó el porcentaje de animales que presentaron aparición de crisis clónicas de más de 3 s. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$ vs. el grupo SAL. ### $p = 0.001$ vs. el primer día de tratamiento en el grupo SAL.

En las figuras 28a y 28b se muestra específicamente el último día de tratamiento en el *Kindling*-PTZ, así como la influencia GABAérgica y purinérgica en el mecanismo de acción de la GD.

La prueba estadística de Kruskal-Wallis mostró que la latencia para la aparición de la primera crisis clónica de las extremidades anteriores que duraron más de 3 s, inducidas por el PTZ fue diferente entre los grupos de tratamiento ($H(6) = 39,93$, $p \leq 0.001$; figura 28a).

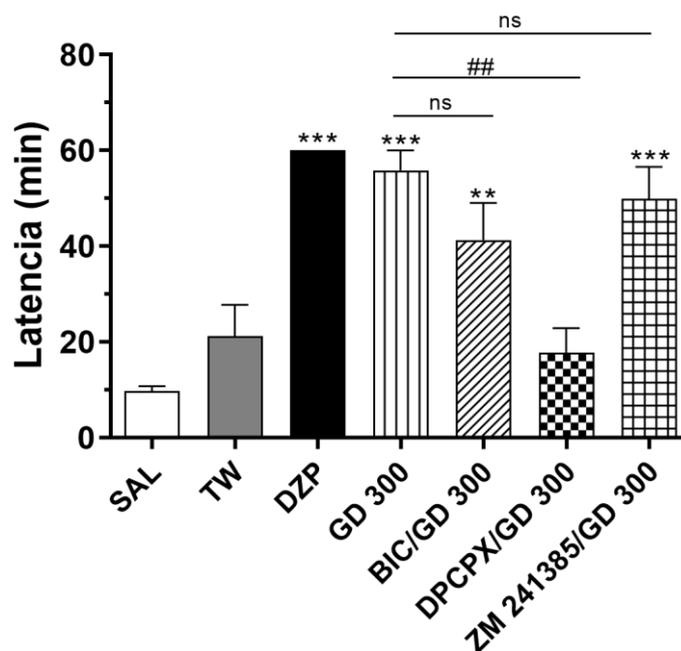
Los animales tratados con la GD 300 mg/kg tuvieron un aumento significativo en la latencia para la primera crisis ($p \leq 0.001$) y una disminución en el porcentaje de crisis vs. el grupo control ($p \leq 0.001$), (Figuras 28a y 28b) mostrando un efecto protector contra las crisis inducidas por el PTZ.

Cuando comparamos el grupo tratado solo con la GD con el grupo tratado con la GD en combinación con el DPCPX, se observó que había una diferencia estadísticamente significativa, es decir, el antagonista del receptor de adenosina A_1 revirtió la protección inducida por la GD, tanto en la latencia de la aparición de la primera crisis como en el

porcentaje de crisis, como podemos ver en las figuras 28a y 28b ($p \leq 0.01$) y ($p \leq 0.01$), respectivamente.

Por otro lado, al comparar el grupo tratado con la GD con los grupos tratados con la GD en combinación con ZM 241385 o bicuculina, observamos que no hubo diferencias estadísticamente significativas en los dos tratamientos. Tanto el antagonista del receptor de adenosina A_{2A} como el antagonista del receptor de $GABA_A$ no han conseguido modificar los efectos de la GD tanto en la latencia de aparición de la primera crisis ($p = 0.99$; para los dos grupos), como en el porcentaje de crisis ($p = 0.30$) y ($p = 0.58$) respectivamente. Al igual que hemos visto en el modelo previo de AMINOPH, este resultado puede inducirnos a pensar que en el mecanismo de acción de la GD tienen una participación los receptores de adenosina A_1 , pero no los receptores de adenosina A_{2A} .

(a)



(b)

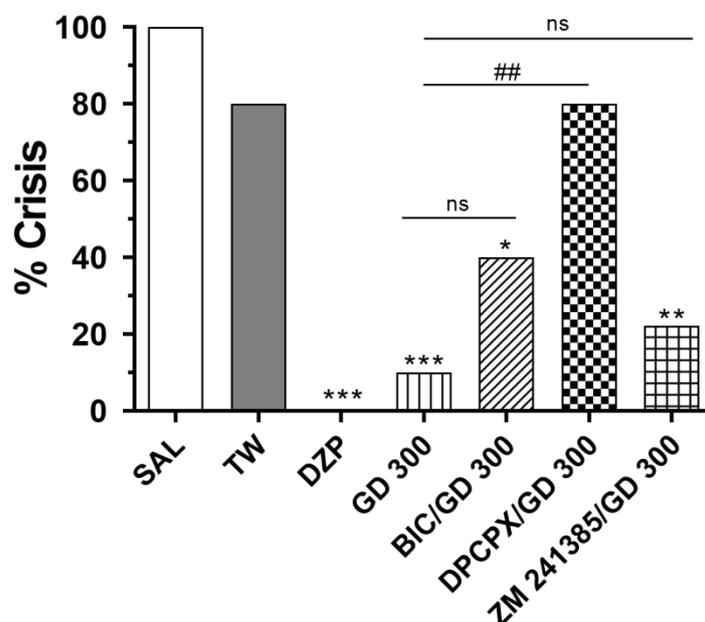


Figura 28: Efecto de la GD (300 mg/kg) en el último día de *Kindling*-PTZ, N=10 animales por grupo. (a) Latencia para aparición de la primera crisis clónica que duró más de 3 s; (b) Porcentaje de crisis clónicas que duró más de 3 s. Los valores representan la media \pm error estándar de la media (e.e.m.). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$ vs. el grupo SAL. ## $p \leq 0.01$ vs. el grupo GD 300.

6.2.3 Western blotting

Para completar los estudios de la posible participación de la GD en los sistemas purinérgico y GABAérgico, se evaluó el efecto de la GD sobre la expresión de las proteínas de los receptores de adenosina A_1 y GABA $_A$ $\alpha 1$ del hipocampo de ratones utilizados en el ensayo anterior (*Kindling*-PTZ), mediante el ensayo de *Western blotting*.

La figura 29a muestra el efecto de la GD en la expresión de proteína del receptor de adenosina A_1 . $F(3,11) = 4.06$, ($p = 0.04$) ANOVA, de una vía.

No se detectaron cambios en la expresión del receptor de adenosina A_1 en el hipocampo de los ratones del grupo SAL/PTZ en comparación con el grupo control SAL/SAL.

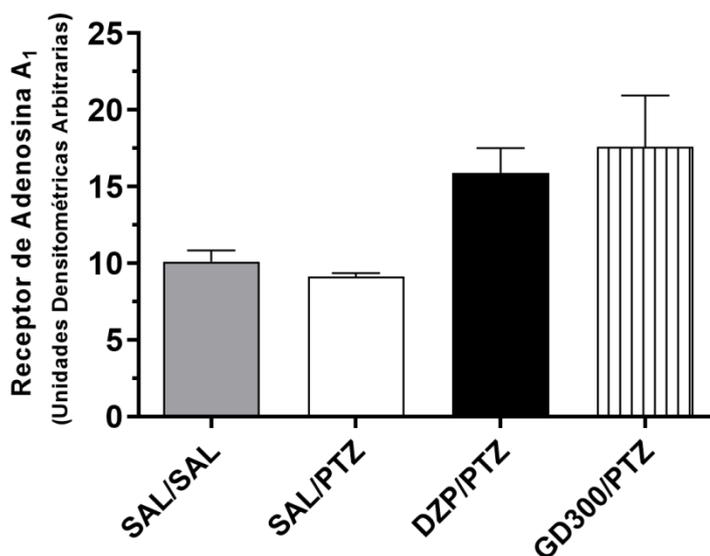
Cuando comparamos el grupo DZP/PTZ y el grupo GD 300/PTZ con el grupo SAL/PTZ observamos un aumento en la expresión proteica del receptor de adenosina A_1 , sin embargo, este aumento no fue estadísticamente significativo.

En la figura 29b se muestra el efecto de la GD en la expresión de la proteína del receptor de GABA $_A$ $\alpha 1$. $F(3,12) = 4.23$, ($p = 0.03$) ANOVA, de una vía.

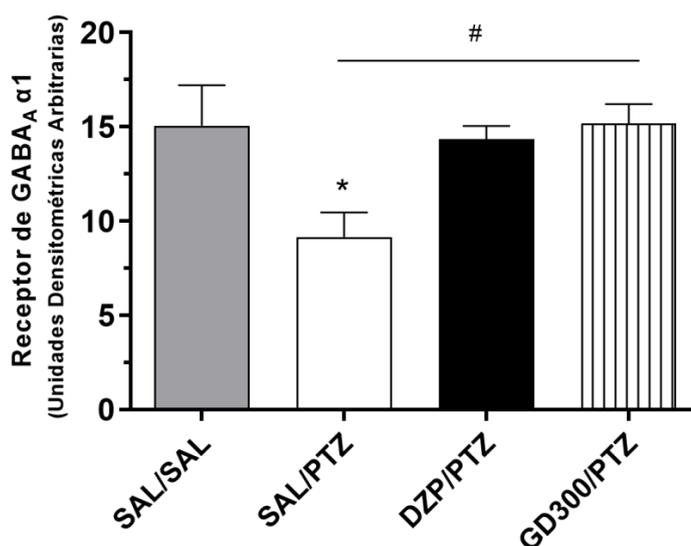
El grupo SAL/PTZ mostró una disminución de la expresión del receptor GABA_A α1 en comparación con el grupo control SAL/SAL ($p \leq 0.05$). Sin embargo, el grupo de GD 300/PTZ causó una regulación positiva estadísticamente significativa en la expresión del receptor de GABA_A α1 ($p \leq 0.05$) en comparación con el grupo SAL/PTZ. Lo mismo sucedió con el grupo tratado con el DZP/PTZ.

En la figura 29c podemos ver las bandas que representan la expresión de las dos proteínas en estudio y la proteína de referencia.

(a)



(b)



(c)

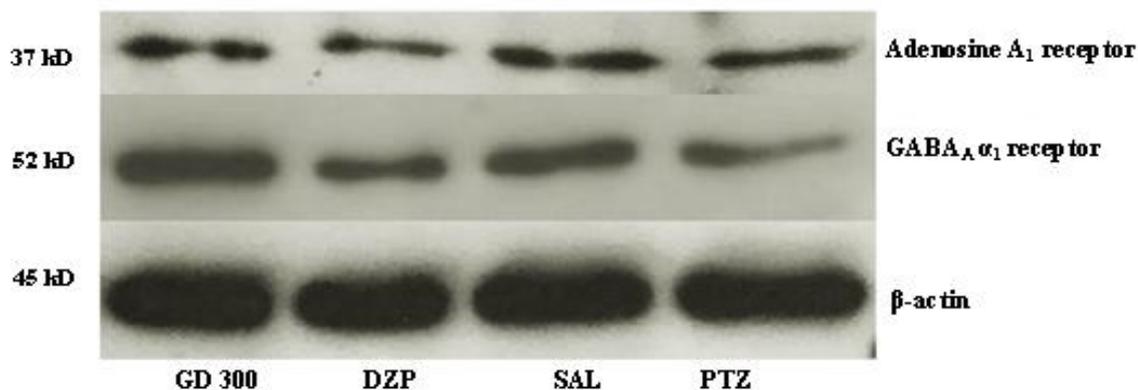


Figura 29: (a) Efecto de la GD (300 mg/kg) sobre la expresión de la proteína del receptor de adenosina A₁, (b) del receptor de GABA_A α1 y (c) bandas representativas del hipocampo de los ratones sometidos al *Kindling*-PTZ (se utilizó β-actina como proteína de referencia). Los valores representan la media ± error estándar de la media (e.e.m.) de N=4 animales por grupo. *p ≤ 0.05 vs. el grupo SAL/SAL; #p ≤ 0.05 vs. el grupo SAL/PTZ.

6.2.4 Unión de la GD a receptores de adenosina A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃

La GD prácticamente no se unió a ninguno de los receptores de adenosina evaluados en este estudio, ya que los porcentajes de inhibición fueron muy bajos (tabla 4a) a una concentración relativamente alta (1 - 10 μM), en comparación con K_i, en el rango nanomolar, para compuestos utilizados como fármacos de referencia estándar, como se muestra en la tabla 4b.

Tabla 4a: Resultados del porcentaje de inhibición de GD en receptores de adenosina

Compuesto	Receptor			
	hA ₁	hA _{2A}	hA _{2B}	hA ₃
	% Inhib. (1μM)	% Inhib. (1μM)	% Inhib. (10μM)	% Inhib. (1μM)
GD	9 ± 3	7 ± 3	17 ± 2	8 ± 2

Tabla 4b: Valores de afinidad (Ki) obtenidos y descritos en la literatura para los compuestos utilizados para validar los ensayos

Receptor	Compuesto	Ki (nM) obtenido	Ki (nM) descrito	Referencia
hA ₁	XAC	14.3	29.1	Klotz <i>et al.</i> , 1998
hA _{2A}	CGS-15943	1.3	4.3	Freedholm <i>et al.</i> , 2001
hA _{2B}	ZM 241385	12.2	32.0	Freedholm <i>et al.</i> , 2001
hA ₃	MRS 1220	1.6	1.7	Gao <i>et al.</i> , 2002

6.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIPARKINSONIANO DE LA GAMMA-DECANOLACTONA

6.3.1 Actividad inhibidora de la GD sobre las isoformas de la enzima MAO

En nuestros experimentos y bajo nuestras condiciones experimentales, descritas en el apartado de material y métodos, la MAO-A humana presentó una constante de Michaelis-Menten (K_m) de $417.17 \pm 38.62 \mu\text{M}$ y una velocidad de reacción máxima (V_{máx}) de 185.67 ± 12.06 nmoles/min/mg de proteína; por su parte, la MAO-B humana mostró unos valores de K_m de $220.33 \pm 32.80 \mu\text{M}$ y V_{máx} de 24.32 ± 1.97 nmoles/min/mg de proteína.

Tanto los inhibidores de referencia, con actividad IMAO, como la GD, inhibieron la actividad enzimática de forma dependiente de la concentración.

El agua Milli-Q y el DMSO utilizados como vehículo no tuvieron efecto farmacológico significativo en los ensayos.

Los resultados de los estudios de inhibición de la MAO-A y la MAO-B por la GD y el índice de selectividad se describen en la tabla 5. La curva concentración-respuesta de la GD (15-150 μM) frente al porcentaje de inhibición de hMAO-B se representa en la figura 30.

Los ensayos enzimáticos revelaron que la GD inhibe la actividad de la isoforma MAO-B, con una CI₅₀ $55.95 \pm 9.06 \mu\text{M}$, aunque esta inhibición es menos potente que la causada por el inhibidor de referencia, la selegilina, que mostró valores de CI₅₀ en el rango nanomolar.

Por otro lado, la GD no inhibió la actividad de la isoforma MAO-A, mostrando un perfil selectivo frente a la MAO-B. Por el contrario, la moclobemida, fármaco de referencia como inhibidor MAO-A mostró un valor de CI₅₀ $361.38 \pm 19.37 \mu\text{M}$.

Tabla 5: Valores CI_{50} e índice de selectividad MAO-B (S.I.) de la GD sobre la actividad enzimática de las isoformas de la MAO

Compuesto	hMAOA (μM) CI_{50}	hMAOB (μM) CI_{50}	S.I.
GD	b	55.95 ± 9.06	$> 1.79^a$
Selegilina	68.73 ± 4.21	0.017 ± 0.0019	4.043
Moclobemida	361.38 ± 19.37	b	$< 0.36^a$

Cada valor de CI_{50} es la media \pm e.e.m. de tres experimentos ($n = 3$). ^b $CI_{50} > 100$. A concentraciones más altas, los compuestos precipitan. [^a] Valores obtenidos suponiendo que el CI_{50} correspondiente frente a MAO-A o MAO-B es la concentración más alta ensayada ($100 \mu\text{M}$). (S.I.) índice de selectividad CI_{50} (hMAO-A)/ CI_{50} (hMAO-B).

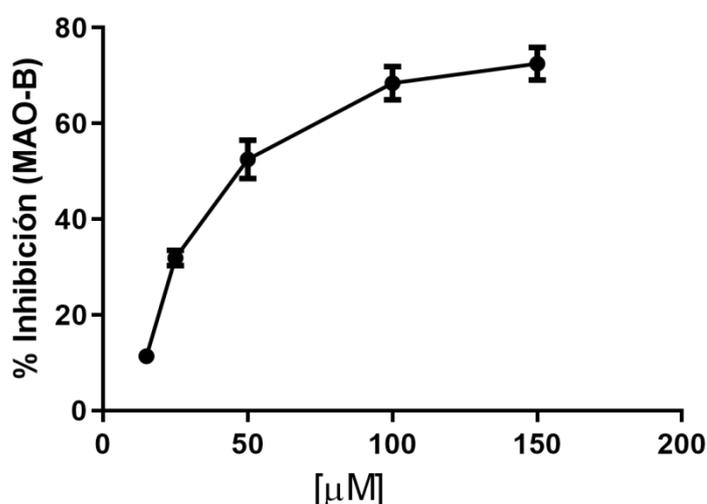


Figura 30: Curva concentración-respuesta de la GD (15-150 μM) frente al porcentaje de inhibición de hMAO-B. Los datos son la media \pm e.e.m.

6.3.2 Reversibilidad de la inhibición de la MAO-B

Dado que la GD ha mostrado tener actividad inhibitoria sobre la isoforma MAO-B, evaluado si es una inhibición reversible o irreversible.

Para ello se utilizó un método de dilución y se tomó como estándar un inhibidor irreversible como la selegilina ($CI_{50} = 0.017 \pm 0.0019 \mu\text{M}$) (Gerlach *et al.*, 1992; Copeland, 2005). Como se muestra en la figura 31, la GD inhibe la actividad de MAO-B de una manera parcialmente reversible.

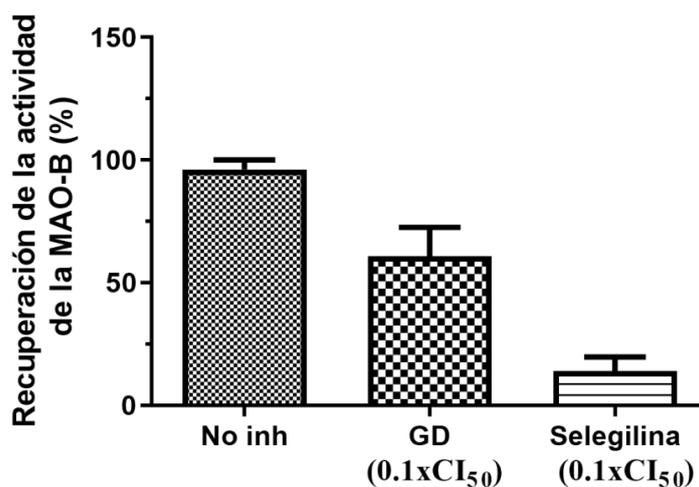


Figura 31: Recuperación de la actividad de hMAO-B tratada con la GD o la selegilina después de 40 min de preincubación y dilución con una concentración de $0.1 \times CI_{50}$ y la actividad enzimática de control (No inh).

Los datos son la media \pm e.e.m.

6.3.3 Estudio de *molecular docking* sobre las isoformas MAO

El *molecular docking* es una estrategia computacional rápida y eficiente para predecir, examinar e identificar nuevas interacciones entre dianas moleculares y ligandos relevantes para el tratamiento de las enfermedades. En esta tesis, aplicamos el *molecular docking* para comprender las características de unión preferencial del ligando GD a la isoforma MAO-B con respecto a la MAO-A. En ambas isoformas, las simulaciones de *docking* revelaron la unión de la GD cerca del sitio activo de la proteína (Figura 33). Estos experimentos revelaron un valor de energía libre de unión mejor (mayor afinidad) para el complejo hMAO-B (-7,8 kcal/mol) que para el complejo hMAO-A (-6,1 kcal/mol).

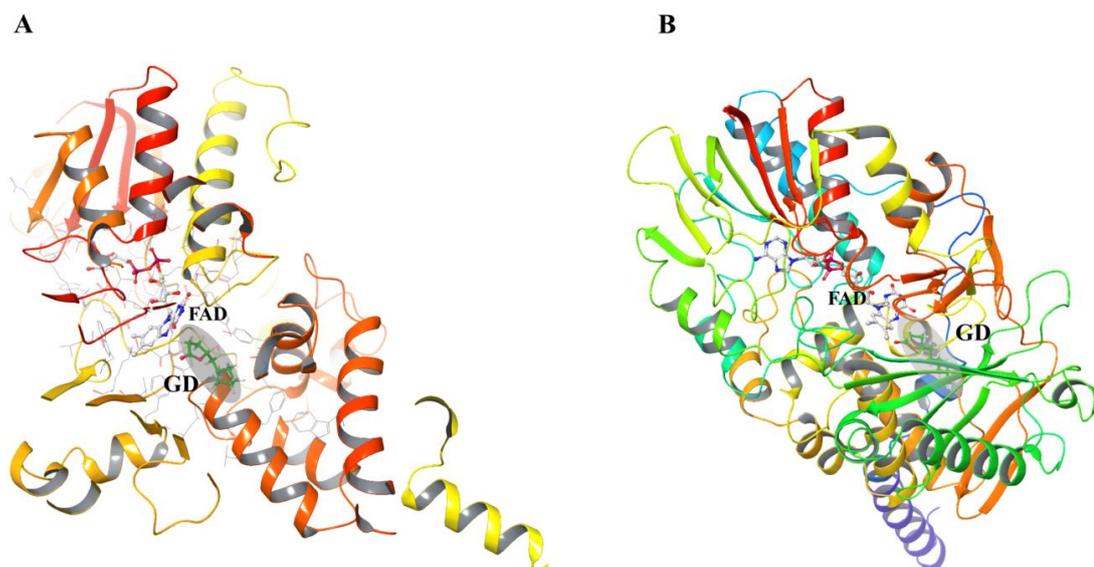


Figura 33: Estructuras del complejo proteína-ligando. (A) La GD acoplada con la isoforma MAO-B humana (B) la GD acoplada con la isoforma MAO-A humana.

La imagen molecular detallada de las interacciones proteína-ligando del ligando GD frente a las dos isoformas de la MAO se muestra en la figura 34. El mejor valor de energía libre de unión observado para la GD frente a la hMAO-B puede asociarse con un mayor número de residuos que participan en la unión con respecto a la isoforma hMAO-A. La GD adopta una conformación relativamente compacta en el sitio activo de la hMAO-B, mientras que observamos una conformación relativamente extendida del ligando GD en la isoforma hMAO-A. En particular, para la proteína hMAO-B notamos que el grupo del ligando, oxolan-2-ona, está involucrado en interacciones no covalentes con los residuos Y398 e Y435, que constituyen el anillo en la región de la cavidad del sustrato. También observamos interacciones favorables de la GD con el residuo Y326 (relacionado con la especificidad del sustrato) y con I199 que actúa como puerta entre la entrada y las regiones de unión al sustrato.

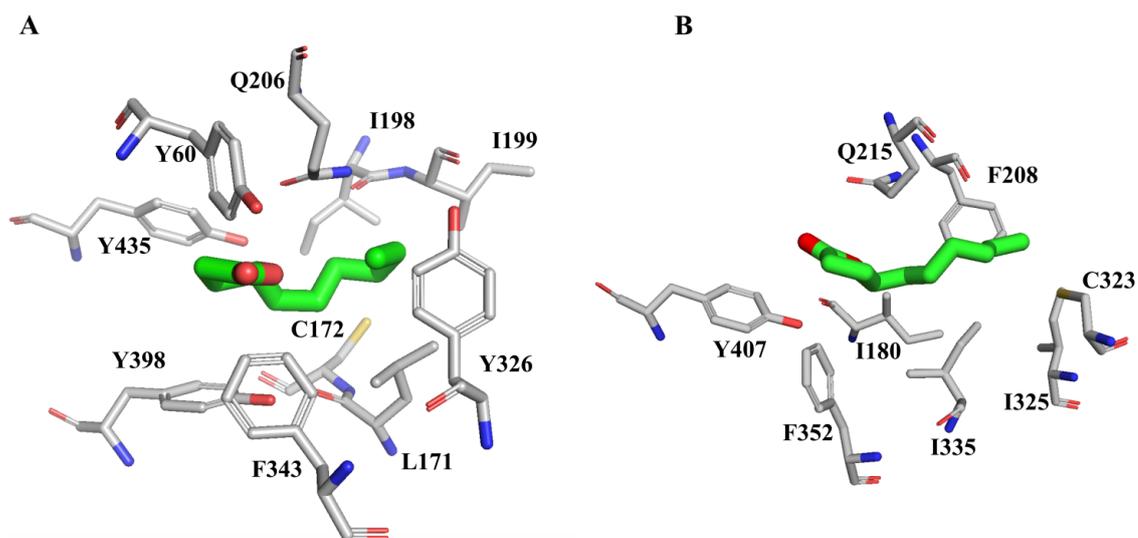


Figura 34: Interacciones proteína-ligando. El ligando GD acoplada a la isoforma MAO-B (A) y a la MAO-A (B). La GD se muestra en verde y los residuos de proteínas clave se muestran en gris.

6.3.4 Actividad citotóxica de la GD en células hepáticas HepG2

En el desarrollo de fármacos es esencial que los nuevos compuestos carezcan de toxicidad a la dosis a la que deben de ser administrados. En este trabajo se evaluó el efecto citotóxico de cuatro concentraciones de la GD (10, 25, 50 y 100 μM) utilizando la línea celular HepG2 y el porcentaje de viabilidad celular se midió como reducción de MTT (Liu *et al.*, 1997).

Como se puede ver en la figura 32, solo la concentración más alta de GD (100 μM) disminuyó significativamente la viabilidad de las células HepG2 ($p \leq 0.01$), demostrando así que la GD en las concentraciones más bajas utilizadas en este estudio no tiene efectos hepatotóxicos. Esos datos son importantes una vez que muestran la seguridad de la dosis de 50 μM de GD, la cual es la CI_{50} en la actividad inhibidora de la MAO-B.

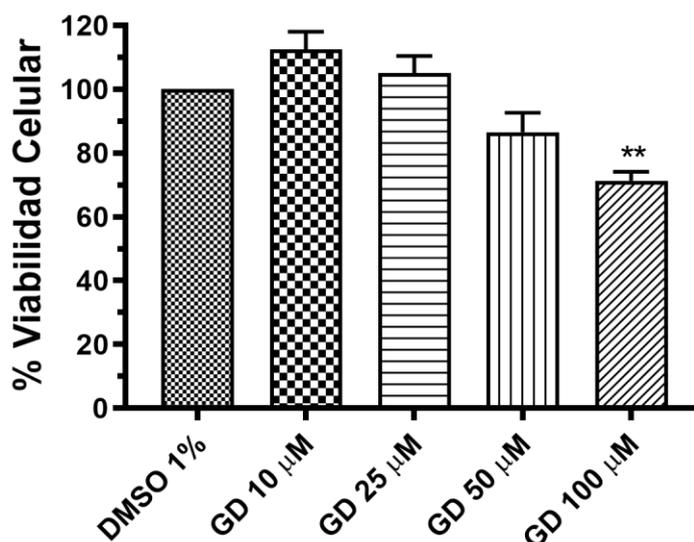


Figura 32: Actividad citotóxica después de 24 h de incubación con la GD a 10, 25, 50 o 100 µM en células HepG2. La viabilidad celular se midió como reducción de MTT y los datos se normalizaron como porcentaje (%) del control tratado con DMSO al 1%. Los resultados se expresan como media \pm e.e.m. de al menos 3 ensayos. (** $p \leq 0.01$), vs. el grupo control.

6.3.5 Ensayo de la coordinación motora

Basándonos en los resultados anteriores descritos para la GD y considerando su actividad *in vitro* como inhibidora de la MAO-B, se utilizó el ensayo de *Rota-rod* para evaluar el efecto de la GD, sobre la coordinación motora en animales de experimentación.

Los estudios se realizaron con ratones no reserpinizados y con ratones reserpinizados. La reserpina bloquea el VMAT2 impidiendo el almacenamiento adecuado de la DA sintetizada. Esto provoca la depleción de las terminaciones nerviosas dopaminérgicas y, entre ellas, las de la vía nigroestriada, dando lugar a bradicinesia, rigidez y desequilibrio en los animales de experimentación, por lo que se utiliza como modelo de la EP.

En los animales no reserpinizados tratados con la GD (300 mg/kg), no se observó ningún efecto negativo en la coordinación motora. De la misma forma no se observó efecto negativo en el grupo tratado con TW (Figura 35).

Los animales del grupo RES/TW/CMCNa mostraron ataxia en todas las medidas ($p < 0.001$) en comparación con el grupo control (animales no reserpinizados), excepto a las 24 horas. Se manifestó una marcada disminución de la coordinación motora a la 01:30h (57.88 ± 21.39 s) (Figura 35).

El tratamiento con la LD+BZ recuperó parcialmente la ataxia después de 01:00h ($158.70 \pm 14.49s$, $p \leq 0.001$) y 01:30h ($139.60 \pm 15.96s$, $p \leq 0.01$) en comparación con el grupo RES/TW/CMCNa (Figura 35).

La GD sola revertió la ataxia después de 01:00h y 01:30h (128.80 ± 22.30 , $p \leq 0.05$ y $126.00 \pm 20.18s$, $p \leq 0.05$; respectivamente, en comparación con el grupo RES/TW/CMCNa (Figura 35).

El tratamiento conjunto de la GD con la LD+BZ, al cabo de 01:30h mostró una potenciación del efecto protector ($162.90 \pm 12.89s$, $p \leq 0.001$) en comparación con el grupo RES/TW/CMCNa. Este tratamiento revertió más rápidamente el estado normal de los animales mostrando que no hay diferencia entre este grupo y el grupo no reserpinizado (grupo control) (Figura 35).

El porcentaje de animales tratados con GD más LD+BZ que fallaron a las 24 h es muy bajo y similar al grupo tratado con vehículo mientras que, al mismo tiempo de evaluación, los grupos tratados solo con la GD o con la LD+BZ tienen un porcentaje de fallos de alrededor del 40% (Figura 36). Estos resultados muestran que existe una potenciación de los efectos farmacológicos con la asociación de la GD más la LD+BZ.

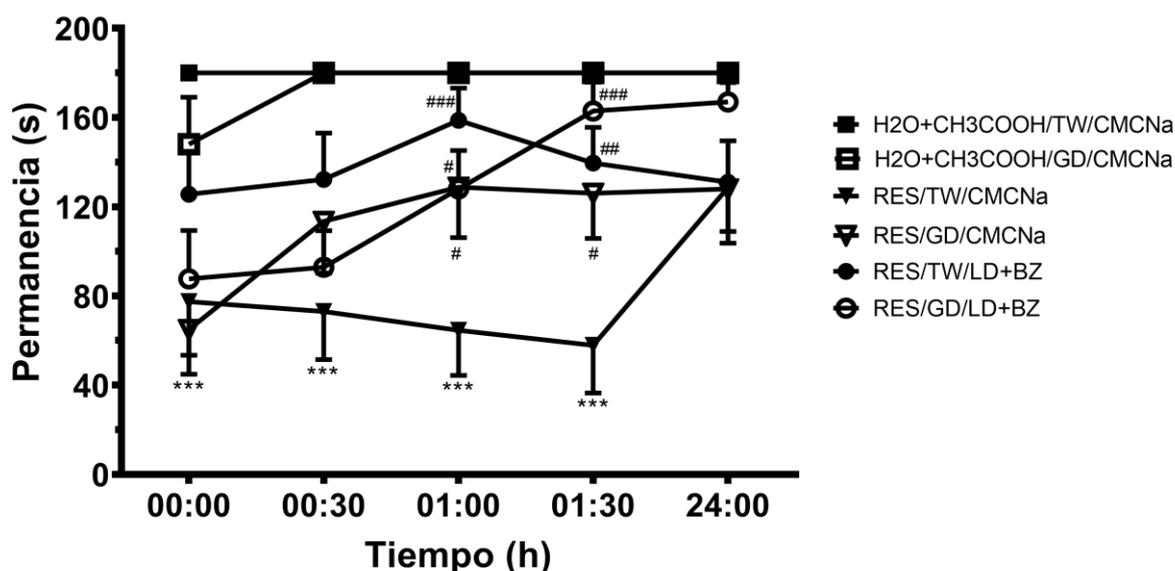


Figura 35: Tiempo de permanencia de los animales en el *Rota-rod*. N=8-12 animales por grupo. (***) $p \leq 0.001$) vs. el grupo $H_2O + CH_3COOH/TW/CMCNa$ y (# $p \leq 0.05$, ## $p \leq 0.01$, ### $p \leq 0.001$) vs. el grupo RES/TW/CMCNa. Tiempo de corte 180s. Los valores representan la media \pm e.e.m.

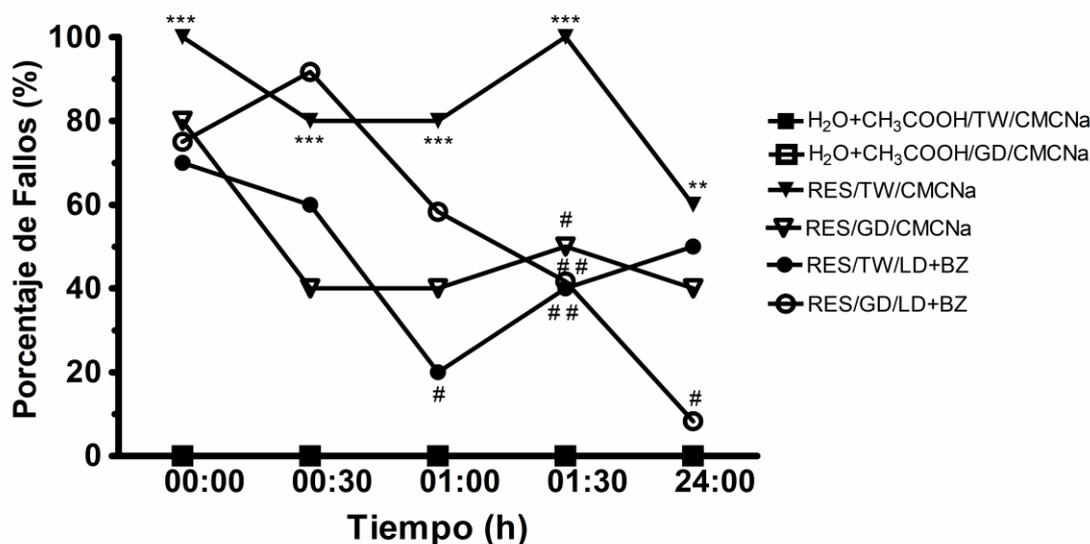


Figura 36: Porcentaje de animales que fallaron en el *Rota-rod*. N=8-12 animales por grupo. (**p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001) vs. el grupo H₂O+CH₃COOH/TW/CMCNa y (#p ≤ 0.05, ##p ≤ 0.01) vs. el grupo RES/TW/CMCNa.

6.3.6 Modificación de la temperatura corporal

Dado que la administración de reserpina disminuye la temperatura corporal de los ratones, evaluamos la temperatura de los animales sometidos al protocolo de reserpina, con el fin de evaluar la posible capacidad de la GD para revertir este cambio de temperatura.

La GD no indujo cambios en la temperatura corporal en ratones no reserpinizados. Los animales reserpinizados mostraron una marcada disminución de la temperatura corporal en todas las medidas ($p \leq 0.001$), excepto a las 24 h, en comparación con los ratones no reserpinizados. La temperatura más baja (32.86 ± 0.54 °C) se alcanzó en la primera medición (00:00) 18 h después de la administración de la reserpina. Solamente el tratamiento con la GD facilitó la reversión significativa de la hipotermia en todos los tiempos medidos ($p \leq 0.01$), excepto a las 24:00 h, en comparación con los animales reserpinizados. A la dosis utilizada en nuestro estudio, la LD+BZ sola o asociada con la GD no indujo cambios en la temperatura corporal de los animales. Prácticamente todos los animales recuperaron la temperatura corporal normal después de 24 h, como se muestra en la figura 37.

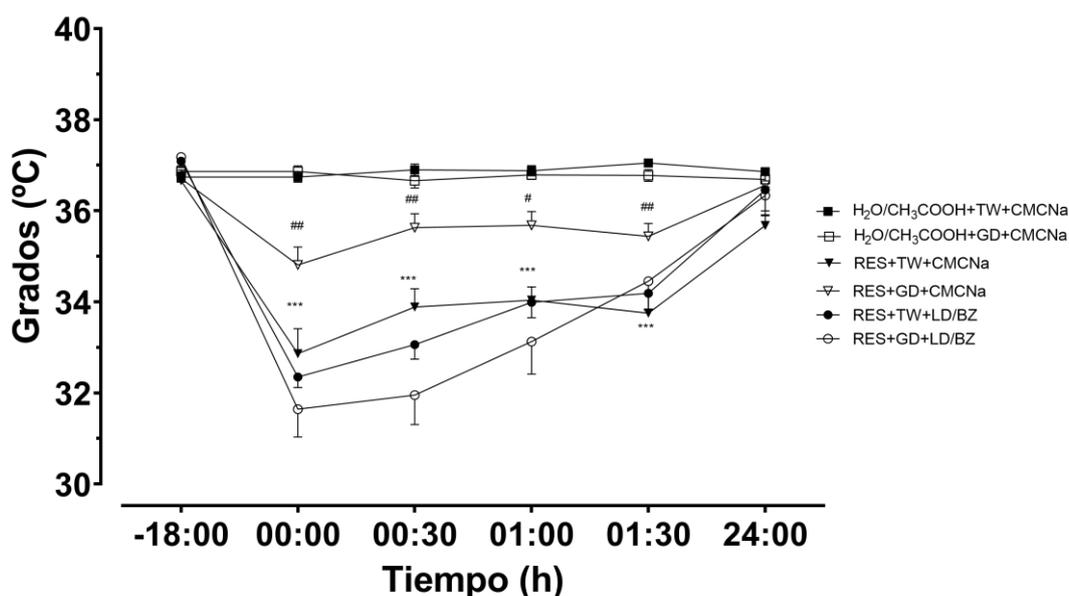


Figura 37: Cambios en la temperatura corporal de los animales. N=8-12 animales por grupo. (**p ≤ 0.001) vs. el grupo H₂O + CH₃COOH/TW/CMCNa y (#p ≤ 0.05, ##p ≤ 0.01) vs. el grupo RES/TW/CMCNa. Los valores representan la media ± e.e.m.

6.3.7 Ensayo de la actividad locomotora - *Open Field Test* (OFT)

A la vista de los resultados anteriormente descritos en este estudio para la GD, tanto *in vitro* como *in vivo*, decidimos evaluar el efecto de la GD en la actividad locomotora de animales de experimentación, utilizando la prueba de campo abierto (OFT).

La evaluación de la actividad locomotora en los animales reserpinizados mostró una reducción significativamente marcada de la distancia total recorrida (en cm), la velocidad (cm/s) y el número de enderezamientos, en comparación con el grupo control tratado con el vehículo ($p \leq 0.001$). Este hallazgo confirma la hipocinesia debida a la disminución de la DA en la vía nigroestriatal, que es causada por la reserpina a la dosis utilizada. El tratamiento con la GD sola (300 mg/kg) o la LD+BZ sola (100:25 mg/kg) y el co-tratamiento con ambos fármacos asociados (GD y LD+BZ), no revirtió la hipocinesia causada por reserpina ($p > 0.05$) en las dosis utilizadas (Figura 38). Además, tampoco se manifestaron cambios en los otros parámetros analizados en este estudio como la velocidad y el enderezamiento, figuras 39 y 40 respectivamente.

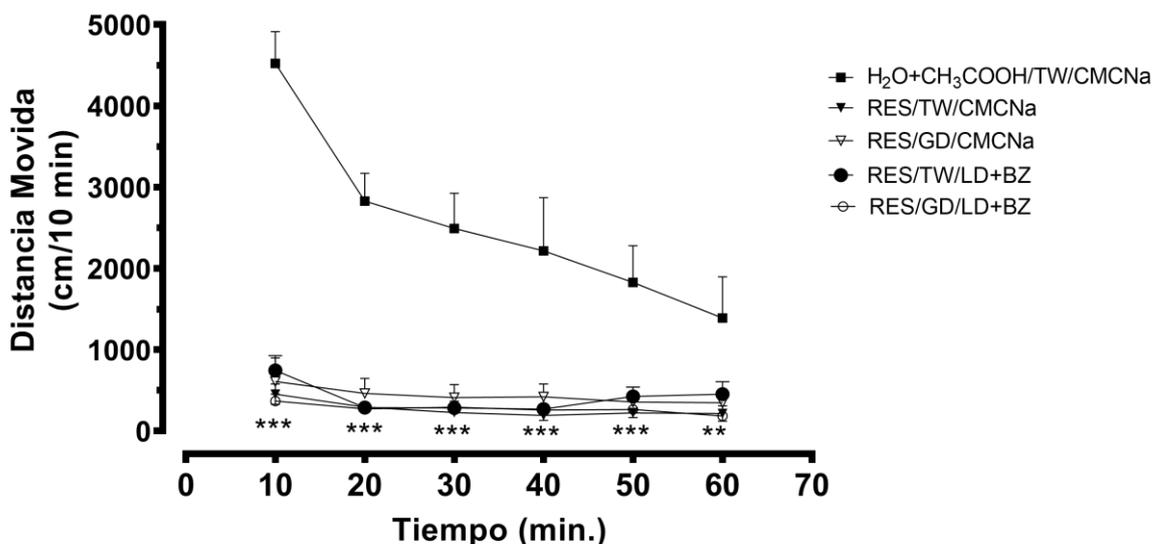


Figura 38: Distancia total recorrida cada diez min, durante una hora de observación de los ratones en la prueba de campo abierto. N=8-12 animales por grupo. (** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001) vs. el grupo de control del vehículo H₂O + CH₃COOH/TW/CMCNa. Los valores representan la media ± e.e.m.

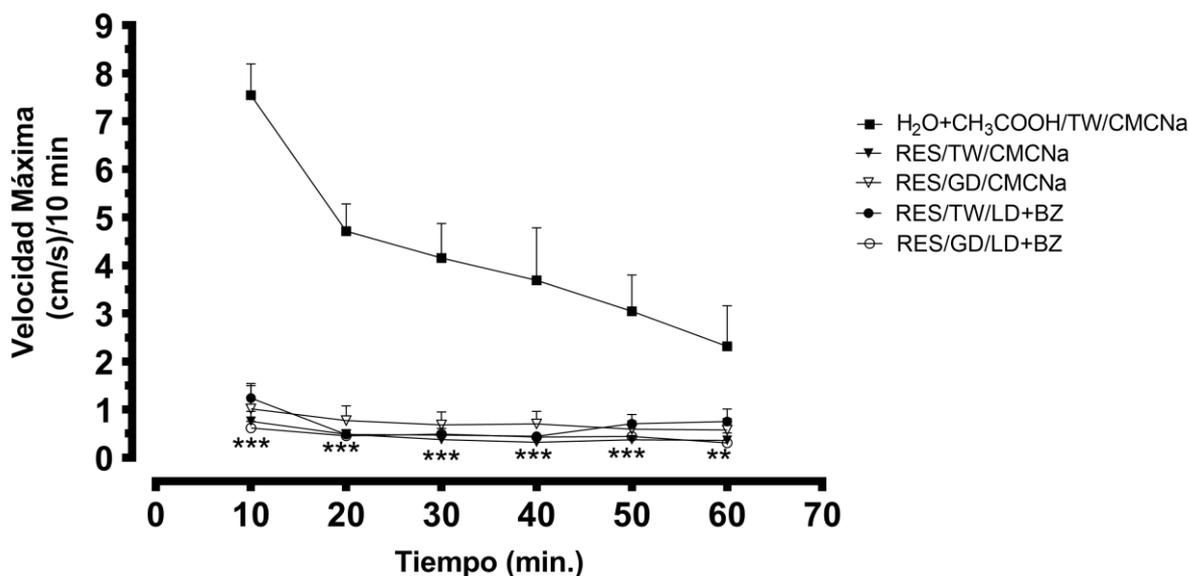


Figura 39: Velocidad máxima cada diez min, durante una hora de observación de los ratones en la prueba de campo abierto. N=8-12 animales por grupo. (** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001) vs. el grupo de control del vehículo H₂O + CH₃COOH/TW/CMCNa. Los valores representan la media ± e.e.m.

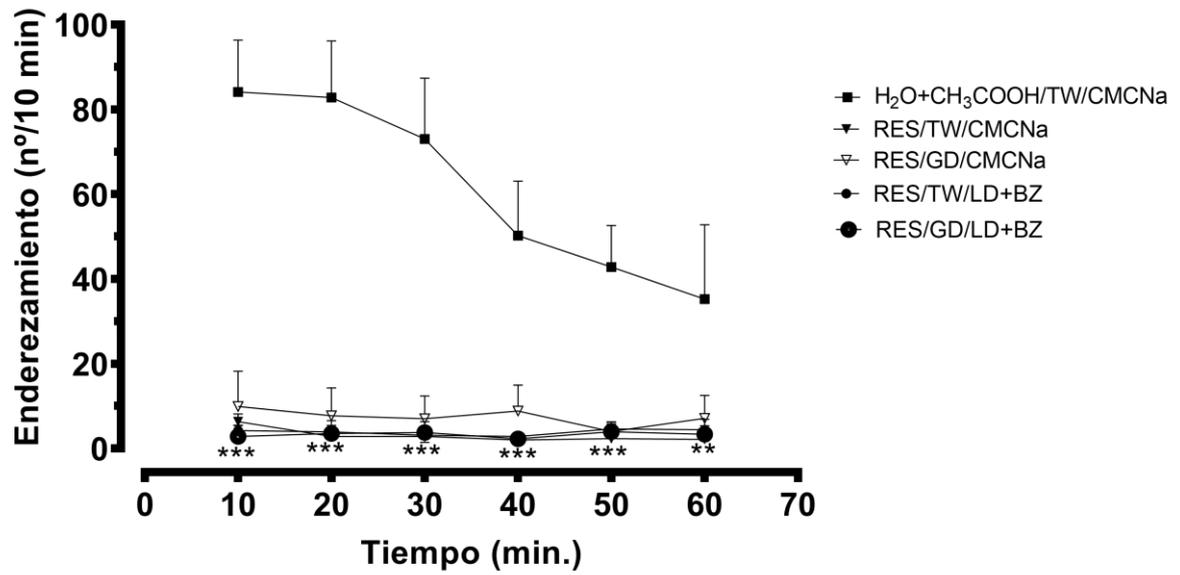


Figura 40: Numero de enderezamiento cada diez min, durante una hora de observación de los ratones en la prueba de campo abierto. N=8-12 animales por grupo. (** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$) vs. el grupo de control del vehículo H₂O + CH₃COOH/TW/CMCNa. Los valores representan la media \pm e.e.m.

DISCUSIÓN

7 DISCUSIÓN

En un intento por descubrir nuevas terapias que sean seguras, efectivas y con escasos o nulos efectos adversos para el tratamiento de enfermedades del SNC, esta tesis ha tenido como objetivo general profundizar en el conocimiento de los efectos neurofarmacológicos y los mecanismos de acción de la GD, con la finalidad de valorar su potencial aplicación en clínica para el tratamiento de dos enfermedades neurológicas prevalentes en la población actual: la epilepsia y la EP.

Una condición básica de cualquier compuesto para actuar en el SNC es poder atravesar la BHE y penetrar en el cerebro.

Muchos investigadores trabajan con la denominada regla de los 5 o regla de Lipinski en la que se recogen una serie de propiedades fisicoquímicas comunes a todas aquellas moléculas que presentan buenas propiedades de solubilidad y permeabilidad (Azam *et al.*, 2012; Matos *et al.*, 2015; Altintop *et al.*, 2018; Sang *et al.*, 2019).

La regla de Lipinski predice que la mala absorción o penetración de un fármaco es más probable cuando hay más de cinco donantes de enlaces de hidrógeno, más de 10 aceptores de enlaces de hidrógeno, el peso molecular es mayor a 500 Da y el LogP es mayor que 5 (Lipinski *et al.*, 1997). Por ello, se determinaron las propiedades fisicoquímicas de la GD y se llevó a cabo la predicción teórica de su paso a través de membranas celulares y específicamente a través de la BHE.

En los estudios *in silico*, realizados con Molispiration y *CBLigand-BBB*, la GD no presentó ninguna violación de la regla de Lipinski y mostró valores predictivos compatibles con los requeridos para atravesar la BHE y alcanzar el SNC, mostrando tener propiedades adecuadas para su uso en estudios *in vivo*.

La epilepsia es una enfermedad neurológica crónica que, aunque ha sido ampliamente estudiada, aún no se conoce en su totalidad. Se sabe que los principales neurotransmisores implicados en esta enfermedad son el GABA y el glutamato, pero, actualmente se ha estudiado la implicación de otros sistemas, como el sistema purinérgico.

La adenosina además de estar asociada con varios procesos del SNC, ha sido implicada en el control de las crisis epilépticas. En modelos animales y en humanos, se ha observado un aumento rápido y significativo de las concentraciones extracelulares de adenosina durante las crisis (Berman *et al.*, 2000; Boison, 2005; Cieślak *et al.*, 2017). En esta tesis, la GD aumentó la latencia hasta la primera crisis tónico-clónica (AMINOPH) y clónica (PTZ) y disminuyó el porcentaje de crisis en comparación con el grupo de control (SAL), tanto en el modelo de crisis agudas (crisis inducidas por AMINOPH) como subcrónicas (*Kindling*-PTZ).

El efecto de la GD observado en el modelo de *Kindling* confirma un estudio previo publicado por nuestro grupo de investigación (de Oliveira *et al.*, 2008), una vez que los resultados del grupo tratado con la GD no muestran diferencia estadísticamente significativa entre el primer y último día de tratamiento ($p = 1.000$), a diferencia del grupo de control SAL ($p \leq 0.001$). Estos datos muestran que la GD, fue capaz de bloquear el proceso de epileptogénesis.

La modulación de receptores mediante la administración de fármacos agonistas o antagonistas, utilizando modelos animales, representa una herramienta muy importante en los estudios de los mecanismos de acción de nuevos compuestos bioactivos. Hasta la fecha se han publicado numerosas investigaciones que utilizan un diseño experimental similar al utilizado en esta tesis (Malhotra *et al.*, 1996; Southam *et al.*, 2002; Uzbay *et al.*, 2007; Akula y Kulkarn 2014).

En los dos modelos utilizados, el pretratamiento con el ZM 241385, un antagonista de A_{2A} , no fue capaz de modificar las respuestas de comportamiento causadas por la GD. Por otro lado, el pretratamiento con el antagonista de receptor de adenosina A_1 (DPCPX) revirtió la protección producida por la GD, tanto en la latencia de aparición de la primera crisis como en el porcentaje de crisis.

Algunos estudios indican que los efectos anticonvulsivos que están relacionados con la activación de receptores de adenosina parecen estar mediados principalmente por la activación del subtipo de receptor A_1 (Berman *et al.*, 2000; Boison, 2005). También se sabe que los compuestos agonistas selectivos de estos receptores de adenosina tienen capacidad anticonvulsivante en diferentes modelos experimentales (Southam *et al.*, 2002; Uzbay *et al.*, 2007; Akula y Kulkarn 2014).

Otros estudios han demostrado que la administración del antagonista de adenosina A_1 (DPCPX), *per se*, en dosis inferiores a 5 mg/kg, no es capaz de producir o potenciar la

inducción de crisis (Malhotra *et al.*, 1996; Southam *et al.*, 2002; Uzbay *et al.*, 2007; Akula y Kulkarni, 2014) que solo puede tener un efecto proconvulsivo a dosis más altas como 10 o 15 mg/kg (Malhotra *et al.*, 1996; Siebel *et al.*, 2015). Así, teniendo en cuenta que en nuestro estudio utilizamos una dosis de DPCPX de 3 mg/kg, nuestra hipótesis es que la capacidad de DPCPX para bloquear el efecto de la GD probablemente esté relacionada con la acción agonista de la GD sobre los receptores de adenosina A₁.

Hasta la actualidad, poco se ha estudiado sobre el mecanismo de acción de la GD, por lo tanto, otras hipótesis pueden estar relacionadas con la participación de este compuesto en la modulación del sistema purinérgico. Una de ellas es la implicación de la GD en la inhibición de la enzima que facilita la conversión de la adenosina en AMP, la ADK, de esta forma se incrementaría el tiempo de permanencia de adenosina con la consiguiente activación de sus receptores.

Existen evidencias de la relación entre astrogliosis, epileptogénesis, aumento de la expresión de ADK y la posterior reducción del nivel de adenosina (Boison, 2005; Boison *et al.*, 2010; Cièslak *et al.*, 2017). Es posible que el aumento terapéutico de la adenosina endógena restablezca los niveles normales de metilación del ADN y evite la progresión de la epilepsia (Williams-Karnesky *et al.*, 2013; Boison, 2016; Chen *et al.*, 2019). Algunos hallazgos sugieren que el aumento de ADK y el aumento del estado de metilación del ADN forman un sistema implicado en la progresión y el mantenimiento de las crisis. Por lo tanto, la desregulación de ADK juega un papel importante en los procesos que convierten un cerebro normal en un cerebro epiléptico (Williams-Karnesky *et al.*, 2013; Hauser *et al.*, 2017).

Considerando que la disminución de la actividad de la ADK sería una buena estrategia terapéutica en el tratamiento de la epilepsia, sería interesante investigar la capacidad de la GD para inhibir la actividad de la ADK, así como los cambios en la metilación del ADN.

En este trabajo, también se evaluó a través del ensayo de *Western blotting* la expresión del receptor de adenosina A₁ en muestras de hipocampo de ratones sometidos al *Kindling*. Estudios previos que evaluaron los efectos agudos o a corto plazo (es decir, después de 24 h de las crisis), encontraron un aumento en la densidad de los receptores A₁ en diferentes regiones del cerebro, ya sea tras la inducción de las crisis por PTZ, pilocarpina, bicuculina o 3-mercaptopropionato (Rebola *et al.*, 2005; Huicong *et al.*, 2013). Por otro lado, crisis inducidas por inyección intraperitoneal de kainato o por estimulación electroconvulsiva no producen cambios en la densidad de los receptores A₁ en el cerebro (Rebola *et al.*, 2005).

Para nuestra sorpresa, en este ensayo de expresión de proteínas, el grupo de control SAL/PTZ no mostró diferencias significativas en la expresión del receptor A₁ en relación el grupo SAL/SAL. Es decir, los animales que tuvieron crisis no expresaron cambios en los receptores de adenosina A₁, en comparación con los animales que no recibieron PTZ (SAL/SAL). Es posible que esto esté relacionado con cambios en la disponibilidad de adenosina ya que, la disminución de la misma, como consecuencia de la actividad de la ADK y su conversión en AMP, conllevaría una menor estimulación de los receptores de A₁ lo cual facilitaría la aparición de crisis epilépticas.

Tanto el grupo tratado con la GD, como el grupo control positivo DZP no aumentaron la expresión del receptor A₁ de forma estadísticamente significativa en comparación con el grupo control.

Sabiendo que la acción de la GD en los dos modelos *in vivo* de crisis epilépticas no se vio afectada por el antagonista del receptor de adenosina A_{2A}, pero, por el contrario, si se vio afectada por el antagonista del receptor de adenosina A₁, investigamos la unión de la GD a los receptores de adenosina (A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃), para una mejor comprensión de la posible actuación de la GD en el sistema purinérgico.

La GD prácticamente no se unió a ninguno de los receptores de adenosina evaluados en este estudio (porcentaje de inhibición inferior al 20%), corroborando el resultado del ensayo de *Western blotting* mencionado anteriormente, en el que no se observaron cambios estadísticamente significativos en la expresión del receptor de adenosina A₁ detectado en el hipocampo de ratones tratados con la GD.

El GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio en el cerebro adulto y los receptores GABAérgicos median la neurotransmisión inhibitoria y evitan que las neuronas se sobreexciten (Lasoñ *et al.*, 2013; Hao *et al.*, 2016). Se ha encontrado pérdida de neuronas GABAérgicas en modelos de epilepsia adquirida, incluido el modelo de *Kindling* y SE (Kainato) (Schwarzer *et al.*, 1995; Buckmaster y Dudek, 1997; Gorter *et al.*, 2001; Houser, 2014). De esta forma también se evaluó en esta tesis la expresión de la subunidad $\alpha 1$ de GABA_A en el hipocampo de ratones sometidos al modelo de *Kindling*. Se observó una disminución en la expresión GABA_A $\alpha 1$ en el grupo SAL/PTZ en comparación con el grupo SAL/SAL.

La administración de la GD fue capaz de incrementar la expresión de GABA_A α 1, así como el control positivo con DZP en comparación con el grupo SAL/PTZ pero no respecto al grupo SAL/SAL.

Se sabe que existe un *crosstalk* que conecta el sistema GABAérgico con la neuroinflamación. Algunas citocinas proinflamatorias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, modulan la función del receptor GABA_A de una manera dependiente del área y de la dosis. Estudios de inmunotinción, realizados por Stellwagen *et al.*, (2005) y Pribiag y Stellwagen, 2013, mostraron que las células de neuronas hipocampales tratadas con TNF- α disminuyeron los receptores GABA_A, reduciendo la neurotransmisión inhibitoria.

Un estudio anterior de nuestro grupo de investigación mostró que la GD inhibió la expresión de TNF- α , en células microgliales activadas por LPS (Pflüger *et al.*, 2016), lo que podría corroborar su efecto sobre la expresión de los receptores GABA_A, como ha quedado demostrado en este estudio de *Western blotting*. En este mismo sentido, hay trabajos que han puesto de manifiesto que el DZP también reduce la expresión del TNF- α (Zavala *et al.*, 1990; Monteiro *et al.*, 2008).

Un estudio publicado previamente por Pflüger *et al.*, (2018a) sugiere que la GD puede actuar modulando positivamente la actividad enzimática de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD), ya que protege contra las crisis inducidas por isoniazida en ratones.

Hay dos isoformas de la GAD, la GAD65 y la GAD67. La GAD65 se localiza en el SNC y páncreas y cataliza la conversión del glutamato (Glu) en GABA y es la enzima limitante de la velocidad de formación de GABA por esta vía (Hao *et al.*, 2016).

Paradójicamente, en esta tesis el pretratamiento con bicuculina un antagonista de los receptores GABA_A, no ha sido capaz de bloquear la protección generada por la GD en el modelo de PTZ-*Kindling*.

Como se comentó anteriormente la GD es capaz de inhibir las crisis subcrónicas inducidas por PTZ en ratones macho (de Oliveira *et al.*, 2008) y recientemente se ha demostrado que la GD también inhibe las crisis agudas inducidas por PTZ en ratones de ambos los sexos (dos Santos, 2020). Además, en un estudio realizado previamente por Pflüger *et al.*, (2018a), la GD no fue capaz de inhibir las crisis inducidas por picrotoxina (PCT).

El alcaloide vegetal PCT tiene capacidad de inducir crisis epilépticas ya que inicialmente se une al canal de cloruro abierto, del que forman parte el receptor GABA_A y el receptor benzodiazepínico, y posteriormente lo estabiliza en un estado de cerrado/en reposo, lo que

explica su bloqueo simultáneo del canal y la actividad antagonista no competitiva de los receptores GABA_A (Chindo *et al.*, 2014; Masiulis *et al.*, 2019).

Por otro lado, la bicuculina (antagonista competitivo GABA_A) actúa ocupando el sitio de unión de los agonistas de los receptores GABA_A, sin embargo, a diferencia del GABA, no produce la rotación de la subunidad β y, por lo tanto, estabiliza el poro del canal cerrado, inactivando así el canal (Masiulis *et al.*, 2019).

El mecanismo por el cual PTZ induce crisis en roedores aún no se ha dilucidado por completo, pero hay pruebas de que puede bloquear la señalización inhibitoria GABAérgica, a través del antagonismo de los receptores GABA_A fijándose en la zona de los tetrazoles del canal del cloro (Dhir, 2012; Reddy y Kuruba 2013). Los fármacos antiepilépticos como DZP y fenobarbital bloquean las crisis inducidas por PTZ y producen sus efectos al facilitar la inhibición mediada por el GABA en el cerebro (Chindo *et al.*, 2014).

Datos electrofisiológicos y bioquímicos sugirieron la participación del sistema glutamatérgico en las crisis inducidas por PTZ, la activación del receptor de N-metil-D aspartato (NMDA) parece estar involucrada en el inicio y propagación de las crisis (Nevins y Arnolde, 1989; Velisek *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2015; Postnikova *et al.*, 2017). En este sentido, fármacos como el felbamato, que bloquea la excitación glutamatérgica mediada por el receptor NMDA, mostró actividad antiepiléptica en el modelo de PTZ (MacDonald y Kelly, 1995; Chindo *et al.*, 2014).

Por lo tanto, teniendo en cuenta los efectos descritos para la GD hasta la fecha, es posible que este compuesto sea capaz de proteger contra las crisis convulsivas inducidas por PTZ al bloquear la neurotransmisión excitadora glutamatérgica mediada por el receptor NMDA, que todavía no se ha comprobado en estudios *in vivo*, pero que en un estudio realizado por Pereira *et al.*, (1997), llevado a cabo a través de un ensayo de *binding*, mostró que la GD era capaz de inhibir la unión específica de L-[3H]-glutamato en la corteza cerebral de ratones.

Otra hipótesis es que la protección de la GD frente a las crisis epilépticas inducidas por PTZ, se deba al aumento de la transmisión inhibitoria GABAérgica, actuando sobre los sitios de unión del receptor GABA_A (canal cloruro), distintos de los sitios de PCT y bicuculina.

Por tal razón, son cruciales estudios adicionales que permitan dilucidar la acción de la GD sobre estos sistemas tan importantes implicados en la fisiopatología de la epilepsia.

En resumen, en la actividad anticonvulsiva de la GD pueden estar implicados los sistemas:

- Purinérgico: La GD al inhibir la ADK, incrementaría los niveles de adenosina y facilitaría así la activación de los receptores A₁.
- GABAérgico: La GD potenciaría o facilitaría la neurotransmisión GABAérgica, al reducir la expresión del TNF- α , lo que conllevaría a un incremento de receptores GABA_A.
- Glutamatérgico: La GD podría antagonizar los efectos del Glu sobre los receptores NMDA

Otro objetivo de esta tesis era abordar la posible utilidad de la GD en el tratamiento de la EP. El gran incremento de pacientes que padecen la EP hace imprescindible la búsqueda de nuevos fármacos más seguros y eficaces. Teniendo en cuenta la posible interrelación entre la epilepsia y las enfermedades neurodegenerativas, como la EP (Vercueil, 2000; Murata *et al.*, 2007; Son *et al.*, 2016; Gruntz *et al.*, 2018; Scorza *et al.*, 2018a; Deuel *et al.*, 2019), la GD también puede resultar eficaz para el tratamiento de la EP.

Los inhibidores de la MAO-B son un grupo de fármacos bien conocidos y eficaces para el tratamiento de la EP (Dézsi y Vécsei, 2017; Edmondson y Binda, 2018). Dichos fármacos reducen la degradación enzimática de la DA por la MAO en las células neurales y gliales, lo que conduce a un aumento de DA en la vía dopaminérgica nigroestriatal que mejora los síntomas motores (actividad locomotora y coordinación motora) en pacientes con EP (Mallajosyula *et al.*, 2008). También aumentan la DA en otras vías dopaminérgicas implicadas en la regulación de la temperatura corporal, inhibición de la secreción de prolactina (PRL), etc. (Blair y Dhillon, 2017; Riederer y Müller 2018).

La selegilina muestra un doble perfil de actividades farmacológicas, por un lado, es un potente fármaco inhibidor selectivo e irreversible de la MAO-B, utilizada en clínica para el tratamiento de la EP y por otro, ejerce actividad anticonvulsiva y acción neuroprotectora en diferentes modelos de epilepsia, incluso en el modelo de PTZ-*Kindling*. (Löscher y Lehmann, 1996).

En un estudio realizado por Hoffmann *et al.* (1997), se evaluó el efecto de la LD, de la selegilina, de un agonista de DA (bromocriptina) y de un antagonista de receptores dopaminérgicos (haloperidol) en un modelo de crisis inducidas por PTZ. Se observó que las administraciones repetidas de selegilina protegían contra las crisis inducidas por PTZ, mientras que la bromocriptina no atenuó las crisis después de una dosis única, ni tampoco

después de la administración repetida. Lo mismo sucedió con el haloperidol, mientras que la LD exhibió actividad proconvulsiva.

Löscher y Lehmann, (1998), también demostraron que la selegilina es un fármaco con actividad anticonvulsiva eficaz y que esa actividad se mantiene y mejora durante el tratamiento crónico.

Estos resultados pueden contribuir a la idea de que el efecto anticonvulsivo de la selegilina en el modelo PTZ probablemente no esté asociado con la neurotransmisión de DA. Estos hallazgos están de acuerdo con otros estudios en los que se encontraron efectos mínimos o nulos de la neurotransmisión de DA en el modelo de PTZ (Killam y Killam, 1984).

Un estudio realizado por Matsumura *et al.*, 2013, mostró que el compuesto indazol disminuye las crisis inducidas por PTZ, estriknina y electroshock en ratones, y por el contrario no protegió frente a las crisis inducidas por bicuculina y PCT. En este mismo estudio, el indazol inhibió la actividad de la enzima MAO-B.

Los compuestos inhibidores de MAO-B más recientes, tienen un mejor perfil de seguridad y tolerabilidad que alguno de los agonistas DAérgicos (Marzo *et al.*, 2004; Blair y Dhillon, 2017; Riederer y Müller 2018; Olaya *et al.*, 2019), lo que hace aún más interesante la búsqueda de nuevos inhibidores de la MAO-B para su uso en el tratamiento de pacientes con EP.

En esta tesis, confirmamos que la GD es un inhibidor selectivo y parcialmente reversible de la MAO-B. Al inhibir la MAO-B podría ejercer posibles efectos neuroprotectores en enfermedades neurodegenerativas, como la EP.

El estudio de *molecular docking* explica este perfil selectivo de la GD por la MAO-B, ya que su unión al sitio activo de la hMAO-B mostró un valor más favorable que el de la hMAO-A.

La inhibición de MAO-B también es potencialmente beneficiosa en la enfermedad neurodegenerativa más predominante, la enfermedad de Alzheimer (EA) (Cai, 2014; Scheidin-Weiss *et al.*, 2017; Park *et al.*, 2019). En estudios posteriores abordaremos la evaluación de la GD en modelos animales de la EA (test de reconocimiento de objetos y otros).

Además, en los estudios de citotoxicidad, solo la concentración más alta de la GD evaluada (100 μ M) disminuyó significativamente la viabilidad de las células HepG2. Todas las demás concentraciones fueron bien toleradas por las células, incluida la concentración 50

μM , valor obtenido en la CI_{50} de la actividad MAO-B, lo que pone de manifiesto la seguridad de este compuesto.

La reducción de la actividad locomotora en ratones inducidas por la reserpina se utiliza con frecuencia como modelo de alteraciones motoras en la EP (Tadaiesky *et al.*, 2006). La hipocinesia-acinesia, el aumento de ataxia (incoordinación motora) y la hipotermia causada por reserpina en ratones se producen debido al bloqueo del transportador de monoaminas vesiculares (VMAT2) que conlleva una disminución intensa y prolongada de DA en todas las terminales nerviosas dopaminérgicas, incluyendo la vía nigroestriatal implicada en los trastornos motores en la EP (Freitas *et al.*, 2016). En este modelo se probaron varios fármacos antiparkinsonianos de uso clínico (p. Ej., LD, sola o asociada con los IDDC -carbidopa, BZ-, los agonistas de los receptores de DA -p. Ej, apomorfina, pramipexol-, el fármaco anticolinérgico trihexifenidilo y el antiviral amantadina), lo que sugiere que tiene validez predictiva para descubrir nuevos fármacos antiparkinsonianos (Menzaghi *et al.*, 1997; Olaya *et al.*, 2019).

En el ensayo de coordinación motora, tanto la GD como la LD+BZ revirtieron parcialmente la ataxia inducida por reserpina después del período de 01:00h. El tratamiento concomitante de la GD con la LD+BZ mostró una potenciación del efecto protector en ratones. Estos datos pueden explicarse por la acción de la GD inhibiendo la actividad MAO-B de forma parcialmente reversible, como se demostró anteriormente en este trabajo, aumentando los niveles de DA y, en consecuencia, mejorando la coordinación motora de los ratones en el *Rota-rod*.

Clásicamente, los agonistas dopaminérgicos y los inhibidores del transportador neuronal de dopamina (DAT)/norepinefrina (NET) están asociados con aumentos de la temperatura corporal en animales mientras que, a la inversa, los antagonistas dopaminérgicos y los que provocan la depleción de DA, como la reserpina, están asociados con una disminución de la temperatura (Lin, 1979; Hasegawa *et al.*, 2005).

Además, según Leon (2004), se ha demostrado que las citocinas proinflamatorias como el $\text{TNF-}\alpha$, las interleucinas (IL) y el interferón-gamma inducen o modulan la hipotermia.

La actividad inhibidora de MAO-B mostrada por la GD, con el consiguiente aumento de DA en el espacio sináptico, junto con la capacidad de la GD para disminuir la expresión de $\text{TNF-}\alpha$ en el modelo de LPS en células microgliales (Pfluger *et al.*, 2016), pueden explicar la reversión parcial de la hipotermia encontrada en este estudio.

La GD o la LD+BZ solas o asociadas no revirtieron la hipocinesia inducida por reserpina en ratones evaluados en el ensayo de campo abierto. No se observaron aumentos en la distancia recorrida, la velocidad o el % de *rearing* en comparación con el grupo tratado con reserpina. Estos resultados coinciden con un estudio de Viana *et al*, (2007), en el cual la GD 300 mg/kg sola, redujo la actividad locomotora de los animales de experimentación.

Posiblemente, los efectos observados en este ensayo estén relacionados con las actividades sedantes e hipnóticas de la GD, descritas por Coelho de Souza *et al*, (1997) en el ensayo de sueño inducido por fenobarbital y por Pflugger *et al*, (2018b) en el ensayo de sueño inducido por DZP. Los efectos sedantes sobre el SNC de otros compuestos monoterpénicos y algunas lactonas han sido informados previamente (Okugawa *et al*, 1996; Ilgün *et al.*, 2020).

En resumen, en esta tesis los principales hallazgos fueron, por un lado, comprobar la capacidad de la GD para inhibir la MAO-B de forma selectiva y parcialmente reversible, lo que unido a los resultados obtenidos *in vivo* la convierten en una molécula potencialmente útil para el tratamiento de la EP. Por otro lado, los efectos anticonvulsivos de la GD en los dos modelos animales de crisis epilépticas estudiados también son dignos de resaltar.

En conclusión, la GD presenta un doble perfil de posible utilidad clínica, tanto en el tratamiento de la EP como en el tratamiento de la epilepsia.

CONCLUSIONES

8 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta tesis y expuestos anteriormente nos permiten establecer las siguientes conclusiones:

1ª.- La GD cumple la regla de los 5 de Lipinski y tiene capacidad para cruzar la BHE.

2ª.- La GD cruzó la BHE en experimentos *in vivo* y protegió a los animales de experimentación frente a las crisis agudas inducidas por AMINOPH y frente las crisis subcrónicas inducidas por PTZ.

3ª.- En el mecanismo de acción anticonvulsivo de la GD pueden estar implicados tres sistemas: purinérgico, GABAérgico y glutamatérgico:

- Purinérgico: La GD al inhibir la ADK, incrementaría los niveles de adenosina y se facilitaría la activación de los receptores A₁.

- GABAérgico: La GD potenciaría o facilitaría la neurotransmisión GABAérgica al reducir la expresión del TNF- α , lo que conllevaría a un incremento de receptores GABA_A.

- Glutamatérgico: La GD podría antagonizar los efectos del Glu sobre los receptores NMDA.

4ª.- La GD se une de forma preferente a la MAO-B inhibiéndola de forma parcialmente reversible, lo que le puede conferir un perfil neuroprotector y eficacia en el tratamiento de la EP.

5ª.- La GD revirtió parcialmente la ataxia y la hipotermia causadas por la reserpina en los estudios *in vivo* y también potenció los efectos de la asociación LD+BZ. Por el contrario, no revirtió la hipocinesia.

6ª.- La GD presenta un doble perfil de posible utilidad clínica, tanto en el tratamiento de la EP como en el tratamiento de la epilepsia. Tiene las propiedades deseables para ser candidata a fármaco o bien servir como plantilla para el diseño de nuevos fármacos con las actividades farmacológicas mencionadas previamente.

BIBLIOGRAFÍA

9 BIBLIOGRAFÍA

Abg Abd Wahab DY, Gau CH, Zakaria R, Muthu Karuppan MK, A-Rahbi BS, Abdullah Z, Alrafiah A, Abdullah JM, Muthuraju S. Review on Cross Talk between Neurotransmitters and Neuroinflammation in Striatum and Cerebellum in the Mediation of Motor Behaviour. *Biomed Res Int*. 2019, 1767203.

Akula KK, Kulkarni SK. Effect of curcumin against pentylentetrazolinduced seizure threshold in mice: possible involvement of adenosine A1 receptors. *Phytother Res*. 2014, 28: 714–721.

Akyuz E, Polat AK, Eroglu E, Kullu I, Angelopoulou E, Paudel YN. Revisiting the role of neurotransmitters in epilepsy: An updated review. *Life Sci*. 2021, 265:118826.

Alonso Cánovas A, Luquin Piudo R, García Ruiz-Espiga P, Burguera JA, Campos Arillo V, Castro A, Linazasoro G, López Del Val J, Vela L, Martínez Castrillo JC. Dopaminergic agonists in Parkinson's disease. *Neurologia*. 2014, 29: 230-41.

Altintop MD, Sever B, Osmaniye D, Sağlık BN, Özdemir A. Design, synthesis, in vitro and in silico evaluation of new pyrrole derivatives as monoamine oxidase inhibitors. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2018, 351(7):e1800082.

Ambrogini P, Torquato P, Bartolini D, Albertini MC, Lattanzi D, Di Palma M, Marinelli R, Betti M, Minelli A, Cuppini R, Galli F. Excitotoxicity, neuroinflammation and oxidant stress as molecular bases of epileptogenesis and epilepsy-derived neurodegeneration: The role of vitamin E. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2019, 1865: 1098-1112.

Angelopoulou E, Pyrgelis E, Piperi C. Neuroprotective potential of chrysin in Parkinson's disease: Molecular mechanisms and clinical implications. *Neurochemistry International*. 2020, 132:104-612.

Armstrong MJ, Okun MS. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. *JAMA*. 2020, 323: 548-560.

Ascherio A, Schwarzschild MA. The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *Lancet Neurol*. 2016, 15: 1257-72.

Azam F, Madi AM, Ali HI. Molecular Docking and Prediction of Pharmacokinetic Properties of Dual Mechanism Drugs that Block MAO-B and Adenosine A(2A) Receptors for the Treatment of Parkinson's Disease. *J Young Pharm*. 2012, 4:184-92.

Bar Am O, Amit T, Youdim MB. Contrasting neuroprotective and neurotoxic actions of respective metabolites of anti-Parkinson drugs rasagiline and selegiline. *Neurosci Lett*. 2004, 355: 169-72.

- Barzroodi Pour M, Bayat M, Golab F, Eftekharzadeh M, Katebi M, Soleimani M, Karimzadeh F. The effect of exercise on GABA signaling pathway in the model of chemically induced seizures. *Life Sci*. 2019, 232:116667.
- Bascuñana P, Javela J, Delgado M, Fernández de la Rosa R, Shiha AA, García-García L, Pozo MÁ. [(18)F]FDG PET Neuroimaging Predicts Pentylentetrazole (PTZ) *Kindling* Outcome in Rats. *Mol Imaging Biol*. 2016, 18: 733-740.
- Bauso DJ, Tartari JP, Stefani CV, Rojas JI, Giunta DH, Cristiano E. Incidence and prevalence of Parkinson's disease in Buenos Aires City, Argentina. *Eur J Neurol*. 2012, 19: 1108-13.
- Beaulieu JM, Gainetdinov RR. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev*. 2011, 63: 182-217.
- Becke AD. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys*. 1993, 98, 5648–5652.
- Bellou V, Belbasis L, Tzoulaki I, Evangelou E, Ioannidis JP. Environmental risk factors and Parkinson's disease: An umbrella review of meta-analyses. *Parkinsonism Relat Disord*. 2016, 23:1-9.
- Ben-Ari, Y. Seizures beget seizures: The quest for GABA as a key player. *Crit Rev Neurobiol*. 2006, 18: 135-144.
- Benito-Leon J. Epidemiología de la enfermedad de Parkinson en España y su contextualización mundial [Epidemiology of Parkinson's disease in Spain and its contextualisation in the world]. *Rev Neurol*. 2018, 66: 125-134.
- Berman RF, Fredholm BB, Aden U, O'Connor WT. Evidence for increased dorsal hippocampal adenosine release and metabolism during pharmacologically induced seizures in rats. *Brain Res*. 2000, 872: 44–53.
- Blauwendraat C, Nalls MA, Singleton AB. The genetic architecture of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 2020, 19:170-178.
- Blair HA, Dhillon S. Safinamide: A Review in Parkinson's Disease. *CNS Drugs*. 2017, 31: 169-176.
- Brettschneider J, Del Tredici K, Lee VMY, Trojanowski JQ. Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: a focus on human studies. *Nat Rev Neurosci*. 2015, 16: 109-120.
- Binda C, Wang J, Pisani L, Caccia C, Carotti A, Salvati P, Edmondson DE, Mattevi A. Structures of human monoamine oxidase B complexes with selective noncovalent inhibitors: safinamide and coumarin analogs. *J Med Chem*. 2007, 50:5848-52.
- Birtwistle J, Baldwin D. Role of dopamine in schizophrenia and Parkinson's disease. *British Journal of Nursing*. 1998, 7: 832–841.

Bispo JMM, Melo JEC, Gois AM, Leal PC, Lins LCRF, Souza MF, Medeiros KAAL, Ribeiro AM, Silva RH, Marchioro M, Santos JR. Sex differences in the progressive model of parkinsonism induced by reserpine in rats. *Behav Brain Res*. 2019, 363: 23-29.

Boison D. Adenosine and epilepsy: from therapeutic rationale to new therapeutic strategies. *Neuroscientist*. 2005, 11: 25–36.

Boison D, Chen JF, Fredholm BB. Adenosine signaling and function in glial cells. *Cell Death Differ*. 2010, 17: 1071-82.

Boison D. The Biochemistry and Epigenetics of Epilepsy: Focus on Adenosine and Glycine. *Front Mol Neurosci*. 2016, 9: 26.

Boka G, Anglade P, Wallach D, Javoy-Agid F, Agid Y, Hirsch EC. Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 1994, 172: 151-54.

Bowery NG. GABAB receptor pharmacology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1993, 33:109-47

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976, 72: 248-254.

Brylinski M, Skolnick J. A threading-based method (FINDSITE) for ligand-binding site prediction and functional annotation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008, 105:129-34.

Brodie MJ. Antiepileptic drug therapy the story so far. *Seizure*. 2010, 19: 650-5.

Brodie MJ, Besag F, Ettinger AB, Mula M, Gobbi G, Comai S, Aldenkamp AP, Steinhoff BJ. Antiepileptic Drugs, and Aggression: An Evidence-Based Reviews. *Pharmacol Rev*. 2016, 68: 563-602.

Buckmaster PS, Dudek FE. Neuron loss, granule cell axon reorganization, and functional changes in the dentate gyrus of epileptic kainate-treated rats. *J Comp Neurol*. 1997, 385: 385-404.

Buhidma Y, Rukavina K, Chaudhuri KR, Duty S. Potential of animal models for advancing the understanding and treatment of pain in Parkinson's disease. *NPJ Parkinsons Dis*. doi: 10.1038/s41531-019-0104-6.

Burnstock G, Krügel U, Abbracchio MP, Illes P. Purinergic signalling: from normal behaviour to pathological brain function. *Prog Neurobiol*. 2011, 95: 229-74.

Busche MA, Hyman BT. Synergy between amyloid- β and tau in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci*. 2020, 23: 1183-1193.

Butler LS, Silva AJ, Abeliovich A, Watanabe Y, Tonegawa S, McNamara JO. Limbic epilepsy in transgenic mice carrying a Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II alpha-subunit mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995, 92: 6852-5.

- Cacabelos R. Parkinson's Disease: From Pathogenesis to Pharmacogenomics. *Int J Mol Sci.* 2017, 18: pii: E551.
- Cai Z. Monoamine oxidase inhibitors: Promising therapeutic agents for Alzheimer's disease (Review) *Mol. Med. Rep.* 2014, 9: 1533 - 1541.
- Capra JA, Laskowski RA, Thornton JM, Singh M, Funkhouser TA. Predicting protein ligand binding sites by combining evolutionary sequence conservation and 3D structure. *PLoS Comput Biol.* 2009, 5:e1000585.
- Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature.* 1957, 180: 1200.
- CBLigand-BBB* (<https://www.cbligand.org/BBB/>) (acceso en junio de 2019).
- Cieślak M, Czarnecka J, Roszek K. The roles of purinergic signaling in psychiatric disorders. *Acta Biochim Pol.* 2016, 63:1-9.
- Cieślak M, Wojtczak A, Komoszyński M. Role of the purinergic signaling in epilepsy. *Pharmacol Rep.* 2017, 69:130-138.
- Chan HH, Tse MK, Kumar S, Zhuo L. A novel selective MAO-B inhibitor with neuroprotective and anti-Parkinsonian properties. *Eur J Pharmacol.* 2018, 818: 254-262.
- Chen H, O'Reilly EJ, Schwarzschild MA, Ascherio A. Peripheral inflammatory biomarkers and risk of Parkinson's disease. *Am J Epidemiol.* 2008, 167: 90-95.
- Chen F, He X, Luan G, Li T. Role of DNA Methylation and Adenosine in Ketogenic Diet for Pharmacoresistant Epilepsy: Focus on Epileptogenesis and Associated Comorbidities. *Front Neurol.* 2019, 10:119.
- Chen JF, Cunha RA. The belated US FDA approval of the adenosine A2A receptor antagonist istradefylline for treatment of Parkinson's disease. *Purinergic Signal.* 2020, 16: 167-174.
- Cheng H, Wang Y, Chen J, Chen Z. The piriform cortex in epilepsy: What we learn from the kindling model. *Exp Neurol.* 2020, 324:113137.
- Chindo BA, Ya'U J, Danjuma NM, Okhale SE, Gamaniel KS, Becker A. Behavioral and anticonvulsant effects of the standardized extract of ficus platyphylla stem bark. *J Ethnopharmacol.* 2014, 154: 351-360.
- Chu NS. Caffeine and aminophylline-induced seizures. *Epilepsia.* 1981, 22: 85-95.
- Coelho de Souza GP, Elisabetsky E, Nunes DS, Rabelo SK, Nascimento da Silva M. Anticonvulsant properties of gamma-decanolactone in mice. *J Ethnopharmacol.* 1997, 58: 175-181.

Cokyaman T, Kasap T, Şehitoğlu H. Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor in the Diagnosis of Febrile Seizure. *Pediatr Int.* 2020, Dec 2. doi: 10.1111/ped.14567.

Colpaert FC. Pharmacological characteristics of tremor, rigidity and hypokinesia induced by reserpine in rat. *Neuropharmacology.* 1987, 26: 1431- 1440.

Connolly BS, Lang AE. Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review. *JAMA.* 2014, 311:1670-83.

Copeland RA. Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery. Wiley Interscience, Hoboken, 2005.

Cristino L, Bisogno T, Di Marzo V. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nat Rev Neurol.* 2020, 16: 9-29.

Da Fonsêca DV, da Silva Maia Bezerra Filho C, Lima TC, de Almeida RN, de Sousa DP. Anticonvulsant Essential Oils and Their Relationship with Oxidative Stress in Epilepsy. *Biomolecules.* 2019, 9:835.

Da Silva LF, Pereira P, Elisabetsky E. A neuropharmacological analysis of PTZ-induced kindling in mice. *Gen Pharmacol.* 1998, 31: 47-50.

Deane R, Wu Z, Zlokovic BV. RAGE (yin) versus LRP (yang) balance regulates alzheimer amyloid beta-peptide clearance through transport across the blood–brain barrier. *Stroke.* 2004, 35(11 Suppl 1): 2628-31.

De Oliveira PA, Lino FL, Cappelari SE, da Silva Brum LF, Picada JN, Pereira P. Effects of gamma-decanolactone on seizures induced by PTZ-Kindling in mice. *Exp Brain Res.* 2008, 187: 161-166.

De Lau LM, Breteler MM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2006, 5: 525-35.

Deuel L, Collins AE, Maa EH, Barr JP, Kern DS. Dravet syndrome and parkinsonism: A case report investigating the dopaminergic system. *Neurology.* 2019, 93, 595 – 596.

Dey A, Kang X, Qiu J, Du Y, Jiang J. Anti-Inflammatory Small Molecules To Treat Seizures and Epilepsy: From Bench to Bedside. *Trends Pharmacol Sci.* 2016, 37: 463-484.

Devinsky O, Vezzani A, Najjar S, Lanerolle NCD, Rogawski MA. Glia and epilepsy: excitability and inflammation. *Trends Neurosci.* 2013, 36: 174-84.

Devinsky O, Marsh E, Friedman D, Thiele E, Laux L, Sullivan J, Miller I, Flamini R, Wilfong A, Filloux F, Wong M, Tilton N, Bruno P, Bluvstein J, Hedlund J, Kamens R, Maclean J, Nangia S, Singhal NS, Wilson CA, Patel A, Cilio MR. Cannabidiol in patients with treatment-resistant epilepsy: an open-label interventional trial. *Lancet Neurol.* 2016, 15: 270-8.

- Devinsky O, Vezzani A, O'Brien TJ, Jette N, Scheffer IE, de Curtis M, Perucca P. Epilepsy. *Nat Rev Dis Primers*. 2018, 4: 18024.
- Dézsi L, Vécsei L. Monoamine Oxidase B Inhibitors in Parkinson's Disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2017, 16: 425-39.
- Dhir A. Pentylentetrazol (PTZ) *Kindling* model of epilepsy. *Curr Protoc Neurosci*. 2012, Chapter 9:Unit9.37.
- Do Santos FM. Avaliação do efeito de Gamma-decanolactona após tratamento subcrônico em camundongos submetidos a modelo de crise epiléptica induzida por pentilenotetrazol. Dissertação (Mestrado em Neurologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre- Brasil. 2020.
- Dobbs RJ, Charlett A, Purkiss AG, Dobbs SM, Weller C, Peterson DW. Association of circulating TNF-alpha and IL-6 with ageing and parkinsonism. *Acta Neurol Scand*. 1999, 100: 34-41.
- Dorsey ER, Sherer T, Okun MS, Bloem BR. The Emerging Evidence of the Parkinson Pandemic. *J Parkinsons Dis*. 2018, 8: S3-S8.
- Duke JA. Handbook of Biologically Active Phytochemicals and their Activities. *CRC Press*. Boca Raton, pp. 3–183, 1992.
- Dunham NW, Miya TS. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficits in rats and mice. *J. Am. Pharm. Assoc*. 1957, 46: 208.
- Duty S, Jenner P. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *Br J Pharmacol*. 2011, 164: 1357-91.
- Edmondson DE, Binda C. Monoamine Oxidases. *Subcell Biochem*. 2018, 87: 117-39.
- Elger CE, Schmidt D. Modern management of epilepsy: a practical approach. *Epilepsy & Behavior*. 2008, 12: 501-539.
- Elisabetsky E, Marschner J, Souza DO. Effects of linalool on glutamatergic system in the rat cerebral cortex. *Neurochemical Research*. 1995, 20: 461-465.
- Engel JJ. Epileptogenesis, Traumatic Brain Injury, and Biomarkers. *Neurobiol Dis*. 2019, 123: 3-7.
- Engel J Jr, Pitkänen A. Biomarkers for epileptogenesis and its treatment. *Neuropharmacology*. 2020, 167: 107735.
- Eyo UB, Murugan M, Wu LJ. Microglia-Neuron Communication in Epilepsy. *Glia*. 2016 May 18. doi: 10.1002/glia.23006.

Fahn S. The medical treatment of Parkinson disease from James Parkinson to George Cotzias. *Mov Disord.* 2015, 30: 4-18.

Ferrendelli JA, Holland KD, McKeon AC, Covey DF. Comparison of the anticonvulsant activities of ethosuximide, valproate, and a new anticonvulsant, thiobutylolactone. *Epilepsia.* 1989, 30: 617-622.

Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, Engel J Jr, Forsgren L, French JA, Glynn M, Hesdorffer DC, Lee BI, Mathern GW, Moshé SL, Perucca E, Scheffer IE, Tomson T, Watanabe M, Wiebe S. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia.* 2014, 55: 475-82.

Fisher RS, Cross JH, D'Souza C, French JA, Haut SR, Higurashi N, Hirsch E, Jansen FE, Lagae L, Moshé SL, Peltola J, Roulet Perez E, Scheffer IE, Schulze-Bonhage A, Somerville E, Sperling M, Yacubian EM, Zuberi SM. Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types. *Epilepsia.* 2017, 58: 531-542.

Foubert-Samier A, Helmer C, Perez F, Le Goff M, Auriacombe S, Elbaz A, Dartigues JF, Tison F. Past exposure to neuroleptic drugs and risk of Parkinson disease in an elderly cohort. *Neurology.* 2012, 79: 1615-21.

Franco V, Perucca E. Pharmacological and Therapeutic Properties of Cannabidiol for *Epilepsy.* *Drugs.* 2019, 79:1435-1454.

Frangaj A, Fan QR. Structural biology of GABAB receptor. *Neuropharmacology.* 2018, 136(Pt A): 68-79.

Frantz AL, Regner GG, Pflüger P, Coelho VR, da Silva LL, Viau CM, de Souza MS, da Silva JB, Picada JN, Saffi J, Pereira P. Manual acupuncture improves parameters associated with oxidative stress and inflammation in PTZ-induced kindling in mice. *Neurosci Lett.* 2017, 661: 33-40.

Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev.* 2001, 53: 527-52.

Fredholm BB, Chen JF, Cunha RA, Svenningsson P, Vaugeois JM. Adenosine and brain function. *Int Rev Neurobiol.* 2005, 63:191-270.

Freitas CM, Busanello A, Schaffer LF, Peroza LR, Krum BN, Leal CQ, Ceretta APC, da Rocha JBT, Fachineto R. Behavioral and neurochemical effects induced by reserpine in mice. *Psychopharmacology.* 2016, 233: 457-467.

French JA. Withdrawal of antiepileptic drugs: an individualised approach. *The Lancet. Neurology.* 2017, 16: 493-494.

French JA, Perucca E. Time to Start Calling Things by Their Own Names? The Case for Antiseizure Medicines. *Epilepsy Curr.* 2020, 20: 69-72.

- Friedman D, French JA, Maccarrone M. Safety, efficacy, and mechanisms of action of cannabinoids in neurological disorders. *Lancet Neurol*. 2019, 18: 504–12.
- Gao ZG, Jacobson KA. 2-Chloro-N(6)-cyclopentyladenosine, adenosine A(1) receptor agonist, antagonizes the adenosine A(3) receptor. *Eur J Pharmacol*. 2002, 443: 39-42.
- García Ruiz PJ. Prehistoria de la enfermedad de Parkinson [Prehistory of Parkinson's disease]. *Neurología*. 2004, 19: 735-7.
- García-Sevilla JA, Meana JJ. Transmisión catecolaminérgica. Fármacos agonistas catecolaminérgicos. En: Flórez J, Armijo JA, Mediavilla A, editores. *Farmacología humana*. 5ªed. Barcelona: Elsevier Masson; 2008. p.295-320.
- Gerlach M, Riederer P, Youdim MB. The Molecular Pharmacology of L-deprenyl. *Eur. J. Pharmacol*. 1992, 226: 97-108.
- Giacobini E, Gold G. Alzheimer disease therapy—moving from amyloid-beta to tau. *Nat Rev Neurol*. 2013, 9: 677-86.
- Goddard GV, McIntyre DC, Leech CK. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp Neuro*. 1969, 25: 295-330.
- Goldberg EM, Coulter DA. Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction. *Nat Rev Neurosci*. 2013, 14: 337-49.
- Gorter JA, van Vliet EA, Aronica E, Lopes da Silva FH. Progression of spontaneous seizures after status epilepticus is associated with mossy fibre sprouting and extensive bilateral loss of hilar parvalbumin and somatostatin-immunoreactive neurons. *Eur J Neurosci*. 2001, 13 :657-69.
- Gruntz K, Bloechliger M, Becker C, Jick SS, Fuhr P, Meier CR, Ruegg S. Parkinson disease and the risk of epileptic seizures. *Ann Neurol*. 2018, 83: 363-374.
- Guilhoto LMFF. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. New paradigms? *J. Epilepsy Clin. Neurophysiol*. 2011, 17:100-105.
- Gulati K, Ray A, Pal G, Vijayan VK. Possible role of free radicals in theophylline-induced seizures in mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2005, 82: 241-5.
- Gullo F, Amadeo A, Donvito G, Lecchi M, Costa B, Constanti A, Wanke E. Atypical "seizure-like" activity in cortical reverberating networks in vitro can be caused by LPS-induced inflammation: a multi-electrode array study from a hundred neurons. *Front Cell Neurosci*. 2014, 8: 361.

Hansen SL, Sperling BB, Sánchez C. Anticonvulsant and antiepileptogenic effects of GABAA receptor ligands in pentylenetetrazolekindled mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2004, 28: 105-113.

Hao F, Jia LH, Li XW, Zhang YR, Liu XW. Garcinol upregulates GABAA and GAD65 expression, modulates BDNF-trkb pathway to reduce seizures in pentylenetetrazole (PTZ)-induced epilepsy. *Med Sci Monit*. 2016, 22: 4415–4425.

Hasegawa H, Meeusen R, Sarre S, Diltoer M, Piacentini MF, Michotte Y. Acute dopamine/norepinephrine reuptake inhibition increases brain and core temperature in rats. *J Appl Physiol (1985)*. 2005, 99: 1397-401.

Hauser RM, Henshall DC, Lubin FD. The Epigenetics of Epilepsy and Its Progression. *Neuroscientist*. 2018, 24:186-200.

Hirsch EC, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol*. 2009, 8: 382-97.

Hoffman A, Afargan M, Backon J, Perlstein I. The anticonvulsant effect of deprenyl on pentylenetetrazol-induced seizures in Lewis rats. *Int J Neurosci*. 1997, 90: 223-32.

Hofmann ME, Frazier CJ. Marijuana, endocannabinoids, and epilepsy: potential and challenges for improved therapeutic intervention. *Exp Neurol*. 2013, 244: 43–50.

Holland KD, McKeon AC, Canney DJ, Covey DF, Ferrendelli JA. Relative anticonvulsant effects of GABA mimetic and GABA modulatory agents. *Epilepsia*. 1992, 33: 981-6.

Houser CR. Do structural changes in GABA neurons give rise to the epileptic state? *Adv Exp Med Biol*. 2014, 813:151-160.

Hunot S, Dugas N, Faucheux B, Hartmann A, Tardieu M, Debré P, Agid Y, Dugas B, Hirsch EC. FcepsilonRII/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells. *J Neurosci*. 1999, 19: 3440-7.

Huicong K, Zheng X, Furong W, Zhouping T, Feng X, Qi H, Xiaoyan L, Xiaojiang H, Na Z, Ke X, Zheng Z, Suiqiang Z. The imbalanced expression of adenosine receptors in an epilepsy model corrected using targeted mesenchymal stem cell transplantation. *Mol Neurobiol*. 2013, 48: 921-30.

Ilie A, Raimondo JV, Akerman CJ. Adenosine release during seizures attenuates GABA_A receptor-mediated depolarization, *J. Neurosci*. 2012, 32: 5321–5332.

İlgün S, Küpeli Akkol E, İlhan M, Çiçek Polat D, Baldemir Kılıç A, Coşkun M, Sobarzo-Sánchez E. Sedative Effects of Latexes Obtained from Some *Lactuca L.* Species Growing in Turkey. *Molecules*. 2020, 25:1587.

Iughetti L, Lucaccioni L, Fugetto F, Predieri B, Berardi A, Ferrari F. Brain-derived neurotrophic factor and epilepsy: a systematic review. *Neuropeptides*. 2018, 72: 23-29.

Jacobson KA, Müller CE. Medicinal chemistry of adenosine, P2Y and P2X receptors. *Neuropharmacology*. 2016, 104: 31-49.

Jaiteh M, Zeifman A, Saarinen M, Svenningsson P, Bréa J, Loza MI, Carlsson JJ. Docking Screens for Dual Inhibitors of Disparate Drug Targets for Parkinson's Disease. *Med Chem*. 2018, 61: 5269-5278.

Jankovic J, Tan EK. Parkinson's disease: etiopathogenesis and treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2020, 91:795-808.

Kalia LV, Lang AE. Parkinson's disease. *Lancet*. 2015, 386: 896-912.

Katzung BG y Trevor AJ. Farmacología básica y clínica. 13ª edición. *Mc Graw Hill Education LANGE*. Mexico, 2016

Killam E K, Killam KF. "Evidence for neurotransmitter abnormalities related to seizure activity in the epileptic baboon." *Federation Proceedings*. 1984, 25: 10-2515.

Klein MO, Battagello DS, Cardoso AR, Hauser DN, Bittencourt JC, Correa RG. Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. *Cell Mol Neurobiol*. 2019, 39: 31-59.

Klotz KN, Hessling J, Hegler J, Owman C, Kull B, Fredholm BB, Lohse MJ. Comparative pharmacology of human adenosine receptor subtypes - characterization of stably transfected receptors in CHO cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1998, 357: 1-9.

Krüger R, Hardt C, Tschentscher F, Jäckel S, Kuhn W, Müller T, Werner J, Voitalla D, Berg D, Kühnl N, Fuchs GA, Santos EJ, Przuntek H, Epplen JT, Schöls L, Riess O. Genetic analysis of immunomodulating factors in sporadic Parkinson's disease. *J Neural Transm*. 2000, 107: 553-62.

Kuder KJ, Załuski M, Schabikowski J, Latacz G, OlejarzMaciej A, Jaśko P, Doroz-Płonka A, Brockmann A, Müller CE, Kieć-Kononowicz K. Novel, dual target-directed annelated xanthine derivatives acting on adenosine receptors and monoamine oxidase B. *ChemMedChem*. 2020, 15: 772-786.

Lasoń W, Chlebicka M, Rejdak K. Research advances in basic mechanisms of seizures and antiepileptic drug action. *Pharmacol Rep*. 2013, 65:787-801.

Ledgerwood CJ, Greenwood SM, Brett RR, Pratt JA, Bushell TJ. Cannabidiol inhibits synaptic transmission in rat hippocampal cultures and slices via multiple receptor pathways. *Br J Pharmacol*. 2011, 162: 286-94.

Lee C, Yang W, Parr RG. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys Rev B Condens Matter*. 1988, 37:785-789.

Lees AJ, Ferreira J, Rascol O, Poewe W, Rocha JF, McCrory M, Soares-da-Silva P; BIPARK-2 Study Investigators. Opicapone as Adjunct to Levodopa Therapy in Patients With Parkinson Disease and Motor Fluctuations: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol.* 2017, 74: 197-206.

Leon LR. Hypothermia in systemic inflammation: role of cytokines. *Front Biosci.* 2004, 9: 1877-1888.

Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeny PJ. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv. Drug Delivery Rev.* 1997, 46: 3-26.

Lin MT. Effects of dopaminergic antagonist and agonist on thermoregulation in rabbits. *J Physiol.* 1979, 293: 217-28.

Liu, Y., Peterson, D.A., Kimura, H., Schubert, D., 1997. Mechanism of Cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. *J Neurochem.* 1997, 69: 581-593.

Liu H, Wang L, Lv M, Pei R, Li P, Pei Z, Wang Y, Su W, Xie XQ. AlzPlatform: an Alzheimer's disease domain-specific chemogenomics knowledgebase for polypharmacology and target identification research. *J Chem Inf Model.* 2014, 54:1050-60.

López-Álvarez J, Sevilla-Llewellyn-Jones J, Agüera-Ortiz L. Anticholinergic Drugs in Geriatric Psychopharmacology. *Front. Neurosci.* 2019, 13:1309.

Löscher W, Lehmann H. L-deprenyl (selegiline) exerts anticonvulsant effects against different seizure types in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996, 277: 1410-7.

Löscher W, Lehmann H. Anticonvulsant efficacy of L-deprenyl (selegiline) during chronic treatment in mice: continuous versus discontinuous administration. *Neuropharmacology.* 1998, 37: 1587-93.

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

Loscher W. Animal Models of Seizures and Epilepsy: Past, Present, and Future Role for the Discovery of Antiseizure Drugs. *Neurochem Research.* 2017, 7: 1873–1888.

Ludányi A, Eross L, Czirják S, Vajda J, Halász P, Watanabe M, Palkovits M, Maglóczy Z, Freund TF, Katona I. Downregulation of the CB1 cannabinoid receptor and related molecular elements of the endocannabinoid system in epileptic human hippocampus. *J Neurosci.* 2008, 28: 2976-90.

Macdonald RL, Kelly KM. Antiepileptic drug mechanisms of action. *Epilepsia.* 1995, 36 Suppl 2:S2-12.

Maglóczy Z, Tóth K, Karlócai R, Nagy S, Eross L, Czirják S, Vajda J, Rásonyi G, Kelemen A, Juhos V, Halász P, Mackie K, Freund TF. Dynamic changes of CB1-receptor expression in hippocampi of epileptic mice and humans. *Epilepsia*. 2010, 51:115-20.

Málaga I, Sánchez-Carpintero R, Roldán S, Ramos-Lizana J, García-Peñas JJ. Nuevos fármacos antiepilépticos en Pediatría [New anti-epileptic drugs in Paediatrics]. *An Pediatr (Barc)*. 2019, 91: 415.e1 - 415.e10.

Mallajosyula JK, Kaur D, Chinta SJ, Rajagopalan S, Rane A, Nicholls DG, Di Monte DA, Macarthur H, Andersen JK. MAO-B elevation in mouse brain astrocytes results in Parkinson's pathology. *PLoS One*. 2008, 3(2), e1616.

Malhotra J, Seth SD, Gupta SK, Gupta YK. Adenosinergic mechanisms in anticonvulsant action of diazepam and sodium valproate. *Environ Toxicol Pharmacol*. 1996, 1: 269-77.

Mares P. Anticonvulsant action of 2-chloroadenosine against pentetrazol-induced seizures in immature rats is due to activation of A₁ adenosine receptors. *J Neural Transm*. 2010, 117: 1269-1277.

Marzo A, Dal Bo L, Monti NC, Crivelli F, Ismaili S, Caccia C, Cattaneo C, Fariello RG. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of safinamide, a neuroprotectant with antiparkinsonian and anticonvulsant activity. *Pharmacol Res*. 2004, 50: 77-85.

Masino SA, Kawamura M, Ruskin DN. Adenosine receptors and epilepsy: current evidence and future potential. *Int Rev Neurobiol*. 2014, 119: 233–255.

Masiulis S, Desai R, Uchański T, Serna Martin I, Laverty D, Karia D, Malinauskas T, Zivanov J, Pardon E, Kotecha A, Steyaert J, Miller KW, Aricescu AR. GABAA receptor signalling mechanisms revealed by structural pharmacology. *Nature*. 2019, 565: 454-459.

Matsumura N, Kikuchi-Utsumi K, Sakamaki K, Watabe M, Aoyama K, Nakaki T. Anticonvulsant action of indazole. *Epilepsy Res*. 2013, 104: 203-16.

Matos MJ, Viña D, Quezada E, Picciau C, Delogu G, Orallo F, Santana L, Uriarte E. A new series of 3-phenylcoumarins as potent and selective MAO-B inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009, 19: 3268-70.

Matos MJ, Vilar S, Gonzalez-Franco RM, Uriarte E, Santana L, Friedman C, Tatonetti NP, Viña D, Fontenla JA. Novel (coumarin-3-yl) carbamates as selective MAO-B inhibitors: synthesis, *in vitro* and *in vivo* assays, theoretical evaluation of ADME properties and docking study. *Eur J Med Chem*. 2013, 63: 151-61.

Mayer B, Stahl V, Kron M. The use of gatekeeping procedures in the statistical planning of animal experiments. *Altern Lab Anim*. 2017, 45: 317-328.

McNamara JO. Kindling: An animal model of complex partial epilepsy. *Annals of Neurology*. 1984, 16: S72S76.

Menzaghi F, Whelan K, Risbrough V, Rao T, Lloyd G. Interactions between a novel cholinergic ion channel agonist, SIB-1765F and L-DOPA in the reserpine model of Parkinson's disease in rats. *J. Pharmacol Exp Ther.* 1997, 280: 393-401.

Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Komure O, Kuno S, Ichinose H, Nagatsu T. Caspase activities and tumor necrosis factor receptor R1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from parkinsonian brain. *J Neural Transm.* 2000, 107: 335-41.

Molinspiration Cheminformatics. Bratislava, Slovak Republic, <https://www.molinspiration.com> (acceso en junio de 2019).

Monteiro DA, Carlos IZ, Pinto FG. Diazepam, em dose única, inibe a migração celular, a estimulação macrofágica e a atividade de TNF- α na reação inflamatória aguda induzida por LPS em camundongos. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 2008, vol. 44, n. 4.

Mori A. Mode of action of adenosine A2A receptor antagonists as symptomatic treatment for Parkinson's disease. *Int Rev Neurobiol.* 2014, 119: 87-116.

Mossman T. Rapid colorimetric assay for celular growth and survival: application to proliferation and citotoxicity assays. *J. Immunol. Meths.* 1983, 65: 55-63.

Mulvihill KG. Presynaptic regulation of dopamine release: Role of the DAT and VMAT2 transporters. *Neurochem Int.* 2019, 122:94-105.

Murata M, Hasegawa K, Kanazawa I. The Japan Zonisamide on PD study group. Zonisamide improves motor function in Parkinson disease: A randomized, double-blind study. *Neurology.* 2007, 68: 45-50.

Nazario LR, da Silva RS, Bonan CD. Targeting Adenosine Signaling in Parkinson's Disease: From Pharmacological to Non-pharmacological Approaches. *Front Neurosci.* 2017, 11: 658.

Nevins ME, Arnolde SM. A comparison of the anticonvulsant effects of competitive and non-competitive antagonists of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Brain Res.* 1989, 503: 1-4.

Nieoczym D, Socała K, Gawel K, Esguerra CV, Wyska E, Wlaź P. Anticonvulsant Activity of Pterostilbene in Zebrafish and Mouse Acute Seizure Tests. *Neurochem Res.* 2019, 44: 1043-1055.

O'Boyle NM, Banck M, James CA, Morley C, Vandermeersch T, Hutchison GR. Open Babel: An open chemical toolbox. *J Cheminform.* 2011, 3:33.

Ochi R, Suemaru K, Watanabe S, Yamaguchi T, Takechi K, Kawasaki H, Araki H. Effect of heat exposure on aminophylline-induced convulsions in mice. *Biol Pharm Bull.* 2011, 34: 666-70.

Olaya MDP, Vergel NE, López JL, Viña MD, Guerrero MF. Coumarin analogue 3-methyl-7H-furo[3,2-g] chromen-7-one as a possible antiparkinsonian agent. *Biomédica* 2019, 39: 491-501.

- Okugawa H, Ueda R, Matsumoto K, Kawanishi K, Kato A. Effect of dehydrocostus lactone and costunolide from *Saussurea* root on the central nervous system in mice. *Phytomedicine*. 1996, 3: 147-53.
- Park JH, Ju YH, Choi JW, Song HJ, Jang BK, Woo J, Chun H, Kim HJ, Shin SJ, Yarishkin O, Jo S, Park M, Yeon SK, Kim S, Kim J, Nam MH, Londhe AM, Kim J, Cho SJ, Cho S, Lee C, Hwang SY, Kim SW, Oh SJ, Cho J, Pae AN, Lee CJ, Park KD. Newly developed reversible MAO-B inhibitor circumvents the shortcomings of irreversible inhibitors in Alzheimer's disease. *Sci Adv*. 2019, 5(3):eaav0316.
- Parkinson J. An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2002, 14: 223-36; discussion 222.
- Pereira P, Elisabetsky E, Souza DO. Effect of gamma-decanolactone on glutamate binding in the rat cerebral cortex. *Neurochem Res*. 1997, 22: 1507–1510.
- Pflüger P, Viau CM, Coelho VR, Berwig NA, Staub RB, Pereira P, Saffi J. Gamma-decanolactone inhibits iNOS and TNF-alpha production by lipopolysaccharide-activated microglia in N9 cells. *Eur J Pharmacol*. 2016, 780: 38-45.
- Pflüger P, Regner GG, Coelho VR, da Silva LL, Nascimento L, Viau CM, Zanette RA, Hoffmann C, Picada JN, Saffi J, Pereira P. Gamma-Decanolactone Improves Biochemical Parameters Associated with Pilocarpine-Induced Seizures in Male Mice. *Curr Mol Pharmacol*. 2018a, 11: 162-169.
- Pflüger P, Coelho VR, Regner GG, da Silva LL, Martinez K, Fonseca A, Viau CM, Pereira P. Neuropharmacological profile of gamma-decanolactone on chemically-induced seizure in mice. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*. 2018b, 18: 222-227.
- Pflüger P, Regner GG, Luft JG, Gonçalves DA, Krebs C, Fontenla JA, Pereira P. Gamma-decanolactone attenuates acute and chronic seizures in mice: a possible role of adenosine A₁ receptors. *Behav Pharmacol*. 2020, 31: 544-552.
- Pitkänen A, Engel J Jr. Past and present definitions of epileptogenesis and its biomarkers. *Neurotherapeutics*. 2014, 11: 231-241.
- Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkmann J, Schrag AE, Lang AE. Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2017, 3: 17013.
- Postnikova TY, Zubareva OE, Kovalenko AA, Kim KK, Magazanik LG, Zaitsev AV. Status Epilepticus Impairs Synaptic Plasticity in Rat Hippocampus and Is Followed by Changes in Expression of NMDA Receptors. *Biochemistry (Mosc)*. 2017, 82: 282-290.
- Pribric H, Stellwagen D. TNF- α downregulates inhibitory neurotransmission through protein phosphatase 1-dependent trafficking of GABA(A) receptors. *J Neurosci*. 2013, 33: 15879-93.

Puschmann A. New Genes Causing Hereditary Parkinson's Disease or Parkinsonism. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2017, 17: 66.

Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1972, 32: 281-94.

Rang y Dale. Farmacología. 2020. 9ª edición. Elsevier España.

Rao SS, Hofmann LA, Shakil A. Parkinson's disease: Diagnosis and treatment. *Am Fam Physician.* 2006, 74: 2046-2054.

Rasgado LAV, Villanueva I, Díaz FV. Effect of γ -ethyl- γ -phenyl-butyrolactone (EFBL), anticonvulsant and hypnotic drug, on mouse brain catecholamine levels. *Acta Pharm.* 2017, 67: 215-226.

Rassolov VA, Ratner MA, Pople JA, Redfern PC, and Curtiss LA. 6-31G* Basis Set for Third-Row Atoms. *J. Comput. Chem.* 2001, 976–984.

Raza C, Anjum R, Shakeel NUA. Parkinson's disease: Mechanisms, translational models and management strategies. *Life Sci.* 2019, 226: 77-90.

Rebola N, Rodrigues RJ, Oliveira CR, Cunha RA. Different roles of adenosine A1, A2A and A3 receptors in controlling kainate-induced toxicity in cortical cultured neurons. *Neurochem Int.* 2005, 47: 317–325.

Reddy SD, Younus I, Sridhar V, Reddy DS. Neuroimaging Biomarkers of Experimental Epileptogenesis and Refractory Epilepsy. *Int J Mol Sci.* 2019, 20: 220.

Reddy DS, Kuruba R. Experimental models of status epilepticus and neuronal injury for evaluation of therapeutic interventions. *Int J Mol Sci.* 2013, 14: 18284-318.

Regner GG, Pereira P, Leffa DT, de Oliveira C, Vercelino R, Fregni F, Torres ILS. Preclinical to Clinical Translation of Studies of Transcranial Direct-Current Stimulation in the Treatment of Epilepsy: A Systematic Review. *Front Neurosci.* 2018, 12:189.

Regner GG, Torres ILS, de Oliveira C, Pflüger P, da Silva LS, Scarabelot VL, Ströher R, de Souza A, Fregni F, Pereira P. Transcranial direct current stimulation (tDCS) affects neuroinflammation parameters and behavioral seizure activity in pentylentetrazole-induced kindling in rats. *Neurosci Lett.* 2020, 735:135162.

Reich SG, Savitt JM. Parkinson's Disease. *Med Clin North Am.* 2019,103: 337-350.

Ribeiro JA. What can adenosine neuromodulation do for neuroprotection? *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 2005, 4: 325-9.

Ribeiro FM, Vieira LB, Pires RG, Olmo RP, Ferguson SS. Metabotropic glutamate receptors and neurodegenerative diseases. *Pharmacol Res.* 2017, 115: 179-191.

Riederer P, Müller T. Monoamine oxidase-B inhibitors in the treatment of Parkinson's disease: clinical–pharmacological aspects. *J Neural Transm.* 2018, 125: 1751-1757.

Rodríguez-Enríquez F, Costas-Lago MC, Besada P, Alonso-Pena M, Torres-Terán I, Viña D, Fontenla JÁ, Sturlese M, Moro S, Quezada E, Terán C. Novel coumarin-pyridazine hybrids as selective MAO-B inhibitors for the Parkinson's disease therapy. *Bioorg Chem.* 2020, 104: 104203.

Rodrigues FB, Ferreira JJ. Opicapone for the treatment of Parkinson's disease. *Expert Opin Pharmacother.* 2017, 18: 445-453.

Rogawski MA, Löscher W, Rho JM. Mechanisms of Action of Antiseizure Drugs and the Ketogenic Diet. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016, 2;6(5):a022780.

Rogawski MA, Löscher W. The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nat Rev Neurosci.* 2004a, 5: 553–564.

Royo AA. Cálculo del tamaño muestral en procedimientos de experimentación con animals. Valoración de las incidencias. *Animales de Laboratorio.* 2014, 62, 31-33.

Romigi A, Bari M, Placidi F, Marciani MG, Malaponti M, Torelli F, Izzi F, Prosperetti C, Zannino S, Corte F, Chiaramonte C, Maccarrone M. Cerebrospinal fluid levels of the endocannabinoid anandamide are reduced in patients with untreated newly diagnosed temporal lobe epilepsy. *Epilepsia.* 2010, 51: 768-72.

Rosenberg EC, Patra PH, Whalley BJ. Therapeutic effects of cannabinoids in animal models of seizures, epilepsy, epileptogenesis, and epilepsy-related neuroprotection. *Epilepsy Behav.* 2017, 70: 319–27.

Roseti C, Martinello K, Fucile S, Piccari V, Mascia A, Di Gennaro G, Quarato PP, Manfredi M, Esposito V, Cantore G, Arcella A, Simonato M, Fredholm BB, Limatola C, Miledi R, Eusebi F. Adenosine receptor antagonists alter the stability of human epileptic GABA_A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008, 105: 15118-23.

Roy A, Yang J, Zhang Y. COFACTOR: an accurate comparative algorithm for structure-based protein function annotation. *Nucleic Acids Res.* 2012, 40(Web Server issue):W471-7.

Salmi P, Chergui K, Fredholm BB. Adenosine-dopamine interactions revealed in knockout mice. *J Mol Neurosci.* 2005, 26: 239-44.

Samii A, Nutt JG, Ransom BR. Parkinson's disease. *Lancet.* 2004, 363: 1783-93.

Sang Z, Wang K, Shi J, Liu W, Tan Z. Design, synthesis, in-silico and biological evaluation of novel chalcone-O-carbamate derivatives as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem.* 2019,178:726-739.

Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, Hirsch E, Jain S, Mathern GW, Moshé SL, Nordli DR, Perucca E, Tomson T, Wiebe S, Zhang YH, Zuberi SM.

ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2017, 58: 512-521.

Schedin-Weiss S, Inoue M, Hromadkova L, Teranishi Y, Yamamoto NG, Wiehager B, Bogdanovic N, Winblad B, Sandebring-Matton A, Frykman S, Tjernberg LO. Monoamine oxidase B is elevated in Alzheimer disease neurons, is associated with γ -secretase and regulates neuronal amyloid β -peptide levels. *Alzheimers Res Ther*. 2017, 9(1): 57.

Schwarzer C, Williamson JM, Lothman EW, Vezzani A, Sperk G. Somatostatin, neuropeptide Y, neurokinin B and cholecystikinin immunoreactivity in two chronic models of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*. 1995, 69: 831-45.

Scorza FA, de Almeida ACG, Fiorini AC, Scorza CA, Finsterer J. Parkinson's disease, epileptic seizures, and sudden death: Three faces of the same coin. *Epilepsy Behav*. 2018a, 83: 238-241.

Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*. 2001, 81: 741-66.

Siebel AM, Piato AL, Schaefer IC, Nery LR, Bogo MR, Bonan CD. Antiepileptic drugs prevent changes in adenosine deamination during acute seizure episodes in adult zebrafish. *Pharmacol Biochem Behav*. 2013, 104: 20-26.

Siebel AM, Menezes FP, Capiotti KM, Kist LW, da Costa Schaefer I, Frantz JZ, Bogo MR, Da Silva RS, Bonan CD. Role of adenosine signaling on pentylentetrazole-induced seizures in zebrafish. *Zebrafish*. 2015, 12: 127-36.

Sills GJ, Rogawski MA. Mechanisms of action of currently used antiseizure drugs. *Neuropharmacology*. 2020, 168:107966.

Siqueira IR, Fochesatto C, Torres IL, da Silva AL, Nunes DS, Elisabetsky E, Netto CA. Antioxidant activities of *Ptychopetalum olacoides* ("muirapuama") in mice brain. *Phytomedicine*. 2007, 14: 763-9.

Smart servier medical art. <https://smart.servier.com/> (acceso en febrero de 2021).

Soliman AM, Fathalla AM, Moustafa AA. Adenosine role in brain functions: Pathophysiological influence on Parkinson's disease and other brain disorders. *Pharmacol Rep*. 2018, 70: 661-667.

Son AY, Biagioni MC, Kamisnki D, Gurevich A, Stone B, Di Rocco A. Parkinson's disease and cryptogenic epilepsy. *Case Rep Neurol Med*. 2016, 374563: 1-4.

Son SY, Ma J, Kondou Y, Yoshimura M, Yamashita E, Tsukihara T. Structure of human monoamine oxidase A at 2.2-Å resolution: the control of opening the entry for substrates/inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008, 105: 5739-44.

Southam E, Stratton SC, Sargent RS, Brackenborough KT, Duffy C, Hagan RM, Pratt GD, Jones SA, Morgan PF. Broad spectrum anticonvulsant activity of BW534U87: possible role of an adenosine-dependent mechanism. *Pharmacol Biochem Behav.* 2002, 74: 111-8.

Staley K. Molecular mechanisms of epilepsy. *Nat Neurosci.* 2015, 18: 367-72.

Stellwagen D, Beattie EC, Seo JY, Malenka RC. Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor alpha. *J Neurosci.* 2005, 25: 3219-3228.

Suero-García C, Martín-Banderas L, Holgado MA. Efecto neuroprotector de los cannabinoides en las enfermedades neurodegenerativas. *Ars Pharm.* 2015, 56: 77-87.

Szyndler J, Maciejak P, Kołosowska K, Chmielewska N, Skórzewska A, Daszczuk P, Płaźnik A. Altered expression of GABA-A receptor subunits in the hippocampus of PTZ-kindled rats. *Pharmacol Rep.* 2018, 70:14-21.

Tadaiesky M, Andreatini R, Vital M. Different effects of 7-nitroindazole in reserpine-induced hypolocomotion in two strains of mice. *Eur J Pharmacol.* 2006; 535:199-207.

Tescarollo FC, Rombo DM, DeLiberto LK, Fedele DE, Alharfoush E, Tomé ÂR, Cunha RA, Sebastião AM, Boison D. Role of Adenosine in Epilepsy and Seizures. *J Caffeine Adenosine Res.* 2020, 10:45-60.

Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem.* 2010, 31:455-61.

Uzbay TI, Kayir H, Ceyhan M. Effects of tianeptine on onset time of pentylenetetrazole-induced seizures in mice: possible role of adenosine A1 receptors. *Neuropsychopharmacology.* 2007, 32: 412–416.

Ułamek-Kozioł M, Czuczwar SJ, Januszewski S, Pluta R. Ketogenic Diet and Epilepsy. *Nutrients.* 2019, 11: 2510.

Van Den Eeden SK, Tanner CM, Bernstein AL, Fross RD, Leimpeter A, Bloch DA, Nelson LM. Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *Am. J. Epidemiol.* 2003, 157: 1015-1022.

Vaidya B, Dhamija K, Guru P, Sharma SS. Parkinson's disease in women: Mechanisms underlying sex differences. *Eur J Pharmacol.* 2021, 895: 173862.

Velíšek L, Veresová S, Pôbisová H, Mares P. Excitatory amino acid antagonists and pentylenetetrazol-induced seizures during ontogenesis. II. The effects of MK-801. *Psychopharmacology (Berl).* 199, 104: 510-4.

Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drugs candidates. *J Med Chem.* 2002, 45: 2615-2623.

Vercueil, L. Parkinsonisms and epilepsy: Case report and reappraisal of an old question. *Epilepsy Behav.* 2000, 1: 128-130.

Vezzani A, French J, Bartfai T, Baram TZ. The role of inflammation in epilepsy. *Nat Rev Neurol.* 2011, 7: 31-40.

Vezzani B, Carinci M, Patergnani S, Pasquin MP, Guarino A, Aziz N, Pinton P, Simonato M, Giorgi C. The Dichotomous Role of Inflammation in the CNS: A Mitochondrial Point of View. *Biomolecules.* 2020, 10: 1437.

Viana CCS, Oliveira PA, Brum LF, Picada JN, Pereira P. Gamma-decanolactone effect on behavioral and genotoxic parameters. *Life Sciences.* 2007, 80: 1014-1019.

Von Campenhausen S, Bornschein B, Wick R, Bötzel K, Sampaio C, Poewe W, Oertel W, Siebert U, Berger K, Dodel R. Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2005, 15: 473-90.

Zarmouh NO, Eyunni SK, Soliman KF. The Benzopyrone Biochanin-A as a reversible, competitive, and selective monoamine oxidase B inhibitor. *BMC Complement Altern Med.* 2017, 17: 34.

Zavala F, Taupin V, Descamps-Latscha B. In vivo treatment with benzodiazepines inhibits murine phagocyte oxidative metabolism and production of interleukin 1, tumor necrosis factor and interleukin-6. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990, 255: 442-50.

Zhang CL, Han QW, Chen NH, Yuan YH. Research on developing drugs for Parkinson's disease. *Brain Res Bull.* 2021, 168: 100-109.

Zhao Y, Xiong S, Liu P, Liu W, Wang Q, Liu Y, Tan H, Chen X, Shi X, Wang Q, Chen T. Polymeric Nanoparticles-Based Brain Delivery with Improved Therapeutic Efficacy of Ginkgolide B in Parkinson's Disease. *Int J Nanomedicine.* 2020, 15:10453-10467.

Zhou YL, Yan YM, Li SY, He DH, Xiong S, Wei SF, Liu W, Hu L, Wang Q, Pan HF, Cheng YX, Liu YQ. 6-O-angeloylplenolin exerts neuroprotection against lipopolysaccharide-induced neuroinflammation in vitro and in vivo. *Acta Pharmacol Sin.* 2020, 41: 10-21.

Zhu X, Dong J, Shen K, Bai Y, Zhang Y, Lv X, Chao J, Yao H. NMDA receptor NR2B subunits contribute to PTZ-kindling-induced hippocampal astrocytosis and oxidative stress. *Brain Res Bull.* 2015, 114: 70-8.

Yang J, Roy A, Zhang Y. Protein-ligand binding site recognition using complementary binding-specific substructure comparison and sequence profile alignment. *Bioinformatics.* 2013, 29: 2588-95.

Ya'u J, Yaro AH, Malami S, Musa MA, Abubakar A, Yahaya SM, Chindo BA, Anuka JA, Hussaini IM. Anticonvulsant activity of aqueous fraction of *Carissa edulis* root bark. *Pharm Biol.* 2015, 53: 1329-38.

Yeung EYH, Cavanna AE. Sleep attacks in patients with Parkinson's disease on dopaminergic medications: a systematic review. *Mov. Disord. Clin. Pract.* 2014, 1: 307-316.

Yow HY, Ahmad N, Makmor BM. Pathogenesis of Epilepsy: Challenges in Animal Models. *Iran J Basic Med Sci.* 2013, 16: 1119-1132.

Wang N, Mi X, Gao B, Gu J, Wang W, Zhang Y, Wang X. Minocycline inhibits brain inflammation and attenuates spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus. *Neuroscience.* 2015, 287:144-56.

Warnecke AMP, Kang MS, Jakowec MW, Davies DL. The macrocyclic lactones ivermectin and moxidectin show differential effects on rotational behavior in the 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res.* 2020, 393: 112804.

Weltha L, Reemmer J, Boison D. The role of adenosine in epilepsy. *Brain Res Bull.* 2019, 151:46-54.

Wieser HG. Behandlung der Epilepsien: Wo stehen wir heute? [Treatment of epilepsy: where are we today?]. *Praxis* (Bern 1994). 1996, 85: 74-79.

Williams-Karnesky RL, Sandau US, Lusardi TA, Lytle NK, Farrell JM, Pritchard EM, Kaplan DL, Boison D. Epigenetic changes induced by adenosine augmentation therapy prevent epileptogenesis. *J Clin Invest.* 2013, 123: 3552-63.

Wood M, Dubois V, Scheller D, Gillard M. Rotigotine is a potent agonist at dopamine D1 receptors as well as at dopamine D2 and D3 receptors. *Br J Pharmacol.* 2015, 172: 1124-35.

World Health Organization. <https://www.who.int/> (acceso en diciembre de 2020).

Wu Q, Peng Z, Zhang Y, Yang J. COACH-D: improved protein-ligand binding sites prediction with refined ligand-binding poses through molecular docking. *Nucleic Acids Res.* 2018, 46(W1):W438-W442.