



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**“DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA DE
CUATRO ANÁLOGOS DE LA 4,4’-DIAMINODIFENILSULFONA EN
UN MODELO EXPERIMENTAL DE NEUROEXCITOTOXICIDAD
INDUCIDA POR ÁCIDO QUINOLÍNICO”**

T E S I S

Que presenta

M. en C. Luis Antonio Tristán López

Para obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

**EN LA ESPECIALIDAD DE
FARMACOLOGÍA**

Directores de Tesis:

Dr. María del Carmen García García

Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda

México, D. F.

AGOSTO DE 2013

El presente trabajo de tesis fue realizada en el Laboratorio 32 del Departamento de Farmacología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, y en el Departamento de Neuroquímica del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”.

Número de beca de CONACYT para estudios de posgrado: 207021

Agradecimientos.....

A mis padres Ferdinando y María Antonia y a mis hermanos Jesús David, Irma Alicia y Ferdinando por su incondicional amor y apoyo. Son y serán siempre lo más importante para mí.

A mi tía Irma, por su presencia y porras a lo largo de todo el camino.

A Patricia Valadez, por su incondicional amistad a lo largo de estos 10 años y por ser el motor durante el último trayecto de este proyecto. Me faltan palabras aún para expresarte mi agradecimiento.

Al Dr. José Antonio Gómez, a su esposa la Dra. Laura Carina García y a la Arq. Diana García, por su invaluable apoyo en casa y por su amistad.

Al Dr. Sergio Montes, por todo el apoyo que como amigo y académico he recibido de su persona.

A los Dres. Camilo Ríos y Víctor Pérez por su guía y apoyo a lo largo de estos años.

A los Doctores María del Carmen García, Francisca Pérez, Sergio Meza, Carlos Cerda y Gilberto Castañeda por las valiosas observaciones hechas al trabajo y por su amable disposición para orientarme cada vez que lo requerí.

A mis compañeros del Laboratorio 32 del Departamento de Farmacología del Cinvestav: Claudia, Rosy, Janice, Sra. Isabel, Horacio y Jorge.

A mis compañeros del Departamento de Neuroquímica: Dany, Olga, Silvia, Ángeles, Yes, Yosh, Laura, Susana, Tere, Lucero, Diana, Maye, Tali, Iván, Moisés, Juan Carlos Martínez, Israel, Jorge Alvarado, Jorge Baruch, C. Flor, C. Gerónimo y Fausto.

A todos mil gracias!.....

“Nunca te despidas, más siempre en tu interior,
a todo lo que veas, dile siempre adiós.
A los pájaros, a las risas, a la queja, a la canción,
a todo lo que escuches, dile siempre adiós.
A los seres, a las cosas, al amor como el dolor,
a todo lo que sientas, dile siempre adiós.
No lo sabes, vas de prisa. No inquieras ¿A dónde voy?.
Resígnate en silencio y di siempre adiós.”

LUIS G. URBINA

ÍNDICE

Contenido	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1. Glutamato	6
1.1.1 Generalidades	6
1.1.2. Receptores de glutamato	7
1.2. Receptor NMDA	8
1.2.1. Generalidades	8
1.2.2. Sitios de modulación	9
1.3. Excitotoxicidad	10
1.3.1. Definición	10
1.3.2. Receptor NMDA y excitotoxicidad	11
1.4. Ácido quinolínico	13
1.4.1. Generalidades	13
1.4.2. Ácido quinolínico y su participación en procesos patológicos	15
1.4.3. Ácido quinolínico como agonista NMDA	15
1.4.4. Ácido quinolínico y excitotoxicidad	16
1.5. Dapsona (DDS)	18
1.5.1. Características físicoquímicas	18
1.5.2. Usos terapéuticos	18
1.5.3. Farmacocinética y distribución	20
1.5.4. Metabolismo y excreción	20
1.5.5. Dapsona como anticonvulsivante y neuroprotector	21
1.5.6. Análogos de dapsona y neuroprotección	23
1.5.7. Efectos adversos de la dapsona	24
1.5.7.1. Metahemoglobinemia y anemia hemolítica	24
1.5.7.2. Efectos adversos idiosincrásicos	27
1.5.7.3. Análogos de la dapsona y producción de metahemoglobina	27
2. JUSTIFICACIÓN	29

3. HIPÓTESIS	30
4. OBJETIVOS	31
4.1. General	31
4.2 Particulares	31
5. MATERIALES Y MÉTODOS	32
5.1. Reactivos	32
5.2. Síntesis orgánica	33
5.2.1. N,N'-ditosilación de los grupos amino de la 4,4'-diaminodifenilsulfona	33
5.2.2. N,N'-dialquilación de los grupos amino del intermediario N,N'-ditosilado de la dapsona	33
5.2.3. Hidrólisis ácida de los grupos tosilo	34
5.3. Evaluación Farmacológica	35
5.3.1. Administración de tratamiento	35
5.3.2. Inyección intraestriatal de ácido quinolínico	35
5.3.4. Prueba de conducta de giro	36
5.3.5. Determinación de GABA intraestriatal	36
5.3.6. Cocientes de concentración líquido cefalorraquídeo-plasma	36
5.4. Evaluación toxicológica	37
5.4.1. Perfiles de porcentajes de metahemoglobina vs tiempo	37
5.4.2. Determinación de metahemoglobina	38
5.5. Tratamiento de datos	39
6. RESULTADOS	39
6.1. Síntesis orgánica	
6.1.1. Producto de la N,N'-ditosilación de los grupos amino de la 4,4'-diaminodifenilsulfona	39
6.1.2. Productos de la N,N'-dialquilación de los grupos amino del intermediario N,N'-ditosilado de la dapsona	43
6.1.3. Productos de la hidrólisis ácida de los grupos tosilo.	57
6.2. Evaluación farmacológica	71
6.2.1. Conducta de giro	71
6.2.2. Determinación de GABA intraestriatal	71

6.2.3. Cocientes de concentración líquido cefalorraquídeo-plasma	73
6.3. Evaluación toxicológica	77
6.3.1. Perfiles de porcentaje de metahemoglobina contra tiempo	77
6.4. Cociente de seguridad (Efectividad/Toxicidad)	79
7. DISCUSIÓN	81
8. CONCLUSIONES	89
9. BIBLIOGRAFÍA	90
10. APENDICE	102
10.1. Publicación	102

RESUMEN

La excitotoxicidad, es uno de los principales mecanismos asociados a muchas patologías humanas del sistema nervioso central, se encuentra caracterizada por la excesiva liberación presináptica de glutamato que activa a diferentes subgrupos de receptores sensibles a dicho aminoácido (AMPA, NMDA y KA) en la membrana postsináptica.

El ácido quinolínico, metabolito producido en la vía de las kinureninas, es un agonista endógeno selectivo de los receptores NMDA y su administración intraestriatal constituye un modelo utilizado para reproducir la excitotoxicidad, la cual está caracterizada por el exceso de acumulación de calcio intracelular y la sobreproducción de radicales libres.

Por otra parte, la 4,4'-diaminodifenilsulfona o dapsona (DDS), es una sulfona cuya efectividad ha sido evaluada en modelos experimentales de crisis convulsivas y neuroexcitotoxicidad. De igual manera, existe evidencia de la actividad anticonvulsivante de algunos análogos N,N'-dialquilados de la DDS en el modelo de crisis convulsivas provocadas por ácido kaínico y de la disminución de la metahemoglobinemia asociada a la formación de metabolitos N-hidroxilados por parte de dichos análogos en experimentos *in vitro*.

El presente trabajo de tesis tiene como objetivo la síntesis y caracterización estructural de cuatro -derivados N,N'-dialquilados de la dapsona (N,N'-dimetilado, N,N'-dietilado, N,N'-dipropilado, y N,N'-dibutilado); realizar la evaluación de su efecto neuroprotector en el modelo de excitotoxicidad producida por la administración intraestriatal de ácido quinolínico en ratas Wistar macho adultas y caracterizar su perfil hematotóxico.

Todos los análogos fueron purificados y su estructura fue caracterizada por resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C de manera previa a su evaluación biológica. La dapsona y sus análogos, fueron administrados 30 minutos antes de la inyección estereotáxica intraestriatal de ácido quinolínico. Seis días después de inducir la lesión, se registró la conducta de giro realizando el conteo de los giros ipsilaterales/60 minutos, inducidos con 1 mg/kg de clorhidrato de apomorfina. Al día siguiente, los animales fueron sacrificados y se realizó la disección del cuerpo estriado lesionado, para determinar los niveles de GABA en el tejido como marcador de daño. En un experimento independiente, se determinó la toxicidad de los análogos en sangre mediante la obtención de sus perfiles de porcentaje de metahemoglobina contra tiempo.

Todos los análogos disminuyeron la frecuencia de los giros significativamente, siendo el más efectivo el análogo N,N'-dimetilado el cual redujo hasta en un 67% las vueltas ipsilaterales al hemisferio lesionado ($p < 0.05$). Sin embargo, no todas las moléculas en estudio evitaron la disminución en el contenido intraestriatal de GABA, siendo el análogo N, N'-dietilado la molécula que presentó una mayor conservación en el nivel del aminoácido (50%) con respecto al grupo control de daño. La correlación de los datos experimentales obtenidos en la determinación del contenido intraestriatal de GABA y el número de giros ipsilaterales al hemisferio lesionado, fue corroborada mediante una prueba de correlación de Spearman ($Rho = -0.487$, $p < 0.01$ bilateral).

El área bajo la curva promedio del porcentaje de metahemoglobina producida por la administración de los análogos fue significativamente menor ($p < 0.05$) a la del grupo que

recibió la molécula original, encontrándose reducciones entre el 31.5% para el análogo N,N'-dimetilado y el 70.6% para el intermediario N,N'-ditosilado, el cual fue adicionalmente evaluado junto a las moléculas propuestas.

El uso de un sistema de microondas para la síntesis orgánica realizada, además de no encontrarse reportado en la literatura, permite un alto rendimiento de las moléculas propuestas. El efecto neuroprotector producido por algunos de los análogos propuestos (N,N'-dimetilado, N,N'-dietilado y N,N'-dibutilado) y su toxicidad hemática disminuida, las convierten en moléculas de interés para completar su perfil farmacológico como posibles opciones terapéuticas en el tratamiento de algunas patologías del sistema nervioso central.

ABSTRACT

Excitotoxicity is one of the main mechanisms of damage related to several pathological disorders of the central nervous system. It is characterized by an excessive presynaptic release of glutamate which activates different subgroups of ionotropic receptors for this aminoacid in the post-synaptic membrane (AMPA, NMDA and kainic acid).

Quinolinic acid, a metabolite produced in the kynurenine pathway, is an endogenous selective agonist of NMDA receptors and its intraestriatal administration is nowadays an experimental model widely used to reproduce the excitotoxicity characterized by the excessive accumulation of intracellular calcium and the high production of free radicals.

4,4'-diaminodiphenylsulfone or dapsone (DDS), is a sulfone whose effectiveness has been evaluated in experimental models of convulsive seizures and neuroexcitotoxicity. Additionally, there is experimental evidence of anticonvulsant properties showed by some N,N'-dialkylated analogues against seizures provoked by kainic acid and their ability to decrease the formation of methemoglobin associated with the production of N-hydroxylated metabolites derived from these analogues in *in vitro* experiments is also previously described in literature.

This thesis work is aimed to: (1) synthesize and characterize structurally four N,N'-dialkylated analogues of dapsone (N,N'-dimethylated, N,N'-diethylated, N,N'-dipropylated, and N,N'-dibutylated) (2) evaluate their neuroprotective effect in a model of excitotoxicity induced by intraestriatal quinolinic acid administration in male adult Wistar rats and (3) characterize the hematotoxic profile of the synthesized analogues.

All analogues were purified and their structures were characterized by ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy previously to biological evaluation. Dapsone and its analogues were administered 30 minutes before stereotaxic intraestriatal quinolinic acid injection. Six days after inducing lesion, circling behavior conduct was registered by counting ipsilateral turns/60 minutes induced by 1 mg/kg of apomorphine hydrochloride. One day after circling behavior test, all animals were sacrificed and corpora striata dissection was performed. Additionally, toxicity in blood caused by the analogues was determined by obtaining the percentage of methemoglobin produced vs time profiles.

All analogues showed protection against circling behaviour. Most effective molecule was the N,N'-dimethylated analogue, which reduced ipsilateral turns up to 67% when compared with the control group ($p < 0.05$). However, not all molecules evaluated showed protection against intraestriatal GABA levels decrease. N,N'-diethylated analogue showed the highest preservation of the aminoacid (50%) when compared with the experimental group administered only with quinolinic acid. Correlation between experimental data from circling behavior test and intraestriatal GABA level determination was confirmed by a Spearman correlation test ($\text{Rho} = -0.487$, $p < 0.01$ bilateral).

Area under curve of the methemoglobin percentage produced by the administration of analogues, was significantly reduced ($p < 0.05$) when compared with the group which received the original molecule (DDS). Methemoglobin reduction values were between

31.5% for the N,N'-dimethylated analogue and 70.6% for the N,N'-ditosylated intermediate which was additionally tested.

Utilization of a microwave system in the organic synthetic route which was used to obtain the proposed analogues, is not reported in literature, and provides a higher product yields when compared with traditional methods. Neuroprotective effect showed by some of the tested analogues (N,N'-dimethylated, N,N'-diethylated and N,N'-dibutylated) and their reduced haematotoxicity, make them interesting molecules for the completion of their pharmacological profile as possible therapeutic options for the treatment of several pathologies of the central nervous system.

Abreviaciones

3-HANA	3-hidroxiantranilato
3-HAO	3-hidroxiantranilato-2,3-dioxigenasa
ABC	Área bajo la curva
ACMS	2-amino-3-carboximuconato-6-semialdehído
AMPA	Ác. α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico
Asp	Aspartato
Bu-DDS	N,N'-dibutildapsona
Ca²⁺	Calcio
DDS	Dapsona
DMSO	Dimetilsulfóxido
Et-DDS	N,N'-dietildapsona
Glu	Glutamato
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
Hb	Hemoglobina
iGluR	Receptor ionotrópico de glutamato
LCR	Líquido cefalorraquídeo
Me-DDS	N,N'-dimetildapsona
MetHb	Metahemoglobina
Mg²⁺	Magnesio
mGluR	Receptor metabotrópico de glutamato
Na⁺	Sodio
NAD⁺	Dinucleótido de nicotinamida adenina
NADH	Dinucleótido reducido de nicotinamida adenina
NMDA	N-metil-D-aspartato
PABA	Ácido <i>para</i> -aminobenzoico
PCP	Fenciclidina
Pr-DDS	N,N'-dipropildapsona
QUIN	Ácido quinolínico
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SON	Sintasa del óxido nítrico
Tos-DDS	N,N'-ditosildapsona
Ka	Constante de absorción
Ke	Constante de eliminación

1. INTRODUCCIÓN

1.1. GLUTAMATO

1.1.1. Generalidades

El glutamato (fig. 1) es uno de los 20-22 aminoácidos proteínogénicos no esenciales, y es aceptado como un neurotransmisor debido a que cumple los cuatro criterios que definen su naturaleza: (1) localización presináptica, (2) liberación provocada por un estímulo fisiológico, (3) acción idéntica a la de transmisores naturales, (4) contar con un mecanismo para la rápida terminación de la acción del transmisor [1].

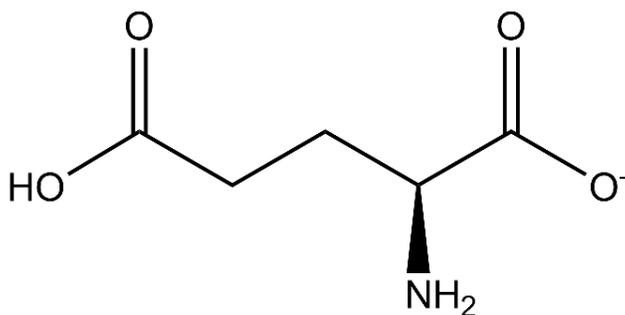


Figura 1. Glutamato

El glutamato es considerado como el principal aminoácido excitatorio en el sistema nervioso central de los mamíferos, donde participa como mensajero neuronal y neurotransmisor en el 40-50% de todas las sinapsis que ocurren en el cerebro y la médula espinal [2, 3]. Este aminoácido se encuentra localizado en neuronas presinápticas, neuronas postsinápticas y células gliales. El glutamato liberado de cualquiera de los compartimentos en los que se encuentra, es transportado principalmente a astrocitos (astroglia), donde mediante la vía de la glutamina-sintetasa es convertido para su almacenaje en forma inactiva en el aminoácido glutamina, donde permanece inactivo hasta que nuevamente la enzima mitocondrial dependiente de fosfato, glutaminasa, vuelve a convertirla en glutamato [4].

La concentración intracelular de glutamato es 10,000 veces mayor a la concentración extracelular del aminoácido. Esto es esencial debido a que los receptores de glutamato solamente pueden ser activados por su unión en el medio extracelular, por lo que los

mecanismos que mantienen baja la concentración extracelular de glutamato son sumamente importantes para el funcionamiento normal del cerebro [5].

El glutamato cumple un papel fisiológico sumamente importante debido a que media la transmisión sináptica rápida y juega un papel esencial en la plasticidad sináptica, la memoria, el aprendizaje y otras funciones cognitivas. Sin embargo también puede desencadenar mecanismos de daño neuronal como consecuencia de la activación de los diferentes receptores para aminoácidos excitatorios [6, 7].

1.1.2. Receptores de glutamato

El glutamato, tiene la capacidad de activar dos clases de receptores en el sistema nervioso central: los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR), los cuales ejercen sus funciones a través del acoplamiento con proteínas-G; y los receptores ionotrópicos de glutamato (iGluR), los cuales al activarse con el ligando apropiado, permiten el paso de cationes a través de un canal-poro formado por las diferentes subunidades del receptor [8].

Los receptores ionotrópicos de glutamato se encuentran subclasificados en tres tipos (Fig 2), de acuerdo a su activación específica por algunos análogos, entre los que se encuentran el N-metil-D-aspartato (NMDA), el ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA) y el ácido kaínico. Los receptores NMDA, son los más estudiados con respecto a la excitotoxicidad por contar con diferentes características relevantes para la muerte neuronal, como su relativamente alta permeabilidad al ion Ca^{2+} y su lenta cinética de activación-desactivación [9, 10].

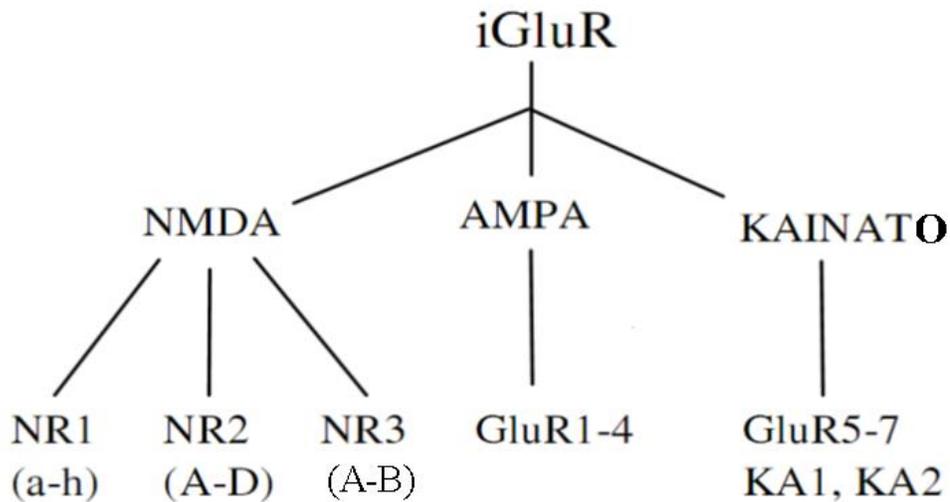


Figura 2. Clasificación de los receptores ionotrópicos de glutamato [8, 9].

1.2. RECEPTOR NMDA

1.2.1. Generalidades

Los receptores NMDA son complejos heteroméricos que incorporan diferentes subunidades entre las cuales se han caracterizado tres subtipos: NR1, NR2 y NR3. Existen ocho diferentes isoformas de la subunidad NR1 generadas por el splicing alternativo de un solo gen (a hasta h), cuatro isoformas de la subunidad NR2 (A hasta D) y dos de la NR3 (A y B) (Fig.2) [9].

La expresión de receptores NMDA funcionales en células de mamíferos requiere de la co-expresión de al menos una subunidad del subtipo NR1 y una del subtipo NR2. Aunque la estequiometría de los receptores NMDA no se ha establecido definitivamente, se encuentra descrito en la literatura que la conformación estructural es tetramérica, incorporando de una manera más frecuente dos subunidades NR1 y dos NR2 de la misma o de diferentes isoformas. En células que expresan subunidades NR3, se ha descrito que dicha subunidad se ensambla con subunidades NR1 y NR2 para formar complejos tetraméricos NR1/NR2/NR3 [11].

Todas las subunidades de los receptores NMDA, presentan una topología membranar similar (Fig 3), con una región N-terminal extracelular, tres segmentos transmembranales

(TM1, TM3 y TM4), un segmento en lazo que se reincorpora a la membrana (M2) formando un poro, un segmento extracelular en lazo entre los segmentos transmembranales TM3 y TM4 y un segmento C-terminal citoplasmático. La longitud del segmento C-terminal es variable de acuerdo al tipo de subunidad y puede proveer de diferentes sitios de interacción con proteínas intracelulares [12].

1.2.2. Sitios de modulación

Funcionalmente el receptor NMDA consiste de 4 dominios: 1) un sitio de reconocimiento en el cual interactúan los transmisores L-glutamato o N-metil-D-aspartato. 2) un sitio para unión para cationes localizado dentro de canal del receptor, donde una molécula de Mg^{2+} puede unirse y bloquear el flujo iónico transmembranal. 3) un sitio de unión para fenciclidina (PCP) que requiere la unión de agonistas al sitio de reconocimiento del neurotransmisor, interactuando con el sitio de unión de cationes y en el cual diferentes anestésicos disociativos (fenciclidina y ketamina) y la dizocipina (MK-801) se unen para bloquear la apertura del canal; y 4) un sitio de unión para glicina que modula alostéricamente la interacción entre el sitio de reconocimiento del transmisor y el sitio de unión de la PCP. El receptor NMDA es modulado por el aminoácido glicina, el cual actúa como un co-agonista cuya presencia es indispensable para su activación (Fig.3) [11, 12].

Adicionalmente se encuentra descrito en el receptor NMDA un sitio para unión de poliaminas, el cual de manera similar al de sitio de unión para glicina, no se encuentra totalmente activado bajo circunstancias fisiológicas normales [13].

Cerca del poro del canal iónico del receptor NMDA, existe un sitio de unión para Zn^{2+} , el cual actúa como un modulador inhibitorio del transporte de iones. Otros moduladores reportados para el receptor incluyen el ácido araquidónico, moléculas con grupos sulfhidrilo y a los protones [14].

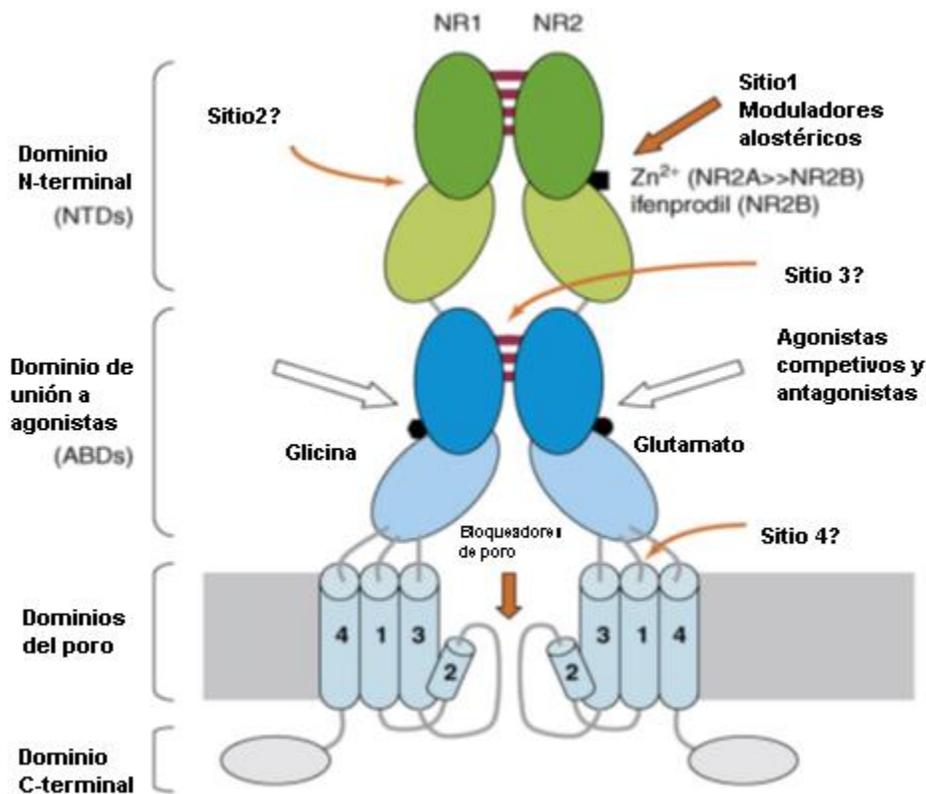


Figura 3. Receptor NMDA, estructura, topología y sitios de unión para ligandos y moduladores alostéricos [11].

1.3. EXCITOTOXICIDAD

1.3.1. Definición

Se define a la excitotoxicidad como a la muerte celular que ocurre a consecuencia de las acciones tóxicas de aminoácidos excitatorios. Dicho concepto, fue acuñado por primera vez por Olney a finales de los años sesenta, al reportar la muerte neuronal por una exposición excesiva a los aminoácidos glutamato (Glu) y aspartato (Asp) [15, 16]. Entre los cambios patológicos desencadenados en las neuronas por la excitotoxicidad se encuentran; la modificación del flujo iónico, la desregulación osmótica, la reducción energética y numerosos cambios bioquímicos que conducen a la muerte celular. La excitotoxicidad es uno de los principales mecanismos de daño que median el daño neuronal en varios desórdenes neurológicos, como la epilepsia, la isquemia, los traumatismos y diferentes padecimientos neurodegenerativos como las enfermedades de Huntington, Alzheimer y Parkinson [17].

1.3.2. Receptor NMDA y excitotoxicidad

El funcionamiento normal del receptor NMDA, depende de un equilibrio dinámico entre los diferentes dominios que lo componen estructuralmente. Cuando este se pierde, se desencadena un malfuncionamiento que deriva en la acumulación de glutamato en la hendidura sináptica, la activación del receptor NMDA y la consecuente entrada neuronal de Ca^{2+} [18]

La activación del receptor NMDA, depende de dos eventos: la despolarización membranal y la liberación de glutamato. La despolarización membranal de las neuronas, promueve la remoción de la molécula de Mg^{2+} permitiendo su posterior activación por glutamato [17].

La administración intracerebroventricular o sistémica de glutamato o de sus análogos provoca una disminución del potencial mitocondrial, la pérdida de la homeostasis del Ca^{2+} y la generación de altos niveles de especies reactivas de oxígeno, nitrógeno así como de 4-hidroxinonenal. La activación de los receptores NMDA por glutamato o sus análogos y la apertura de su canal, permiten el ingreso intracelular de Ca^{2+} , mientras que la activación de los receptores AMPA, permite el ingreso de Na^+ . Estos cambios en el ingreso de Ca^{2+} y Na^+ provocan la despolarización membranal, la amplificación y la prolongación del daño provocado por el glutamato mediante la continuación de la liberación de dicho aminoácido [19].

El incremento en el Na^+ intracelular provoca también la reversión de la extrusión de Ca^{2+} a través del antiporte de 3 iones Na^+ por cada ion Ca^{2+} , provocando un aumento en la cantidad de Ca^{2+} intracelular que conduce a una disfunción mitocondrial y a la disminución en la producción de ATP, el cual provoca a su vez una falla en la bomba Na^+/K^+ que mantiene el estado de reposo el potencial de membrana [20].

La excitotoxicidad mediada por la activación de receptores de glutamato, involucra además de la modificación en el metabolismo de glicerofosfolípidos de membrana, alteraciones en la síntesis de colesterol, en la síntesis de ceramidas, en el metabolismo energético, en la fosforilación de proteínas y en la expresión de genes, enzimas, factores de crecimiento, proteínas de choque térmico y transportadores de iones metálicos divalentes [21, 22].

El incremento en Ca^{2+} citosólico, provoca la activación de fosfolipasas y otras enzimas sensibles a Ca^{2+} como: proteasas, proteincinasas, fosfatasas, la sintasa de óxido nítrico (SON) dependiente de calmodulina y diversas endonucleasas. La activación de dichas enzimas aunada a la reducción energética, la generación de especies reactivas de oxígeno (ej: óxido nítrico, peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo y alcoxilos), la alteración en la homeostasis iónica, la disminución en el potencial redox celular y la activación de muerte celular asociada a señales genéticas, son mecanismos de daño relacionadas con el glutamato y su toxicidad mediada por sus análogos tanto en neuronas como células gliales [23].

En la figura 4 se muestra un diagrama de la cascada excitotóxica derivada de la activación de los receptores ionotrópicos de glutamato que conduce a la muerte neuronal.

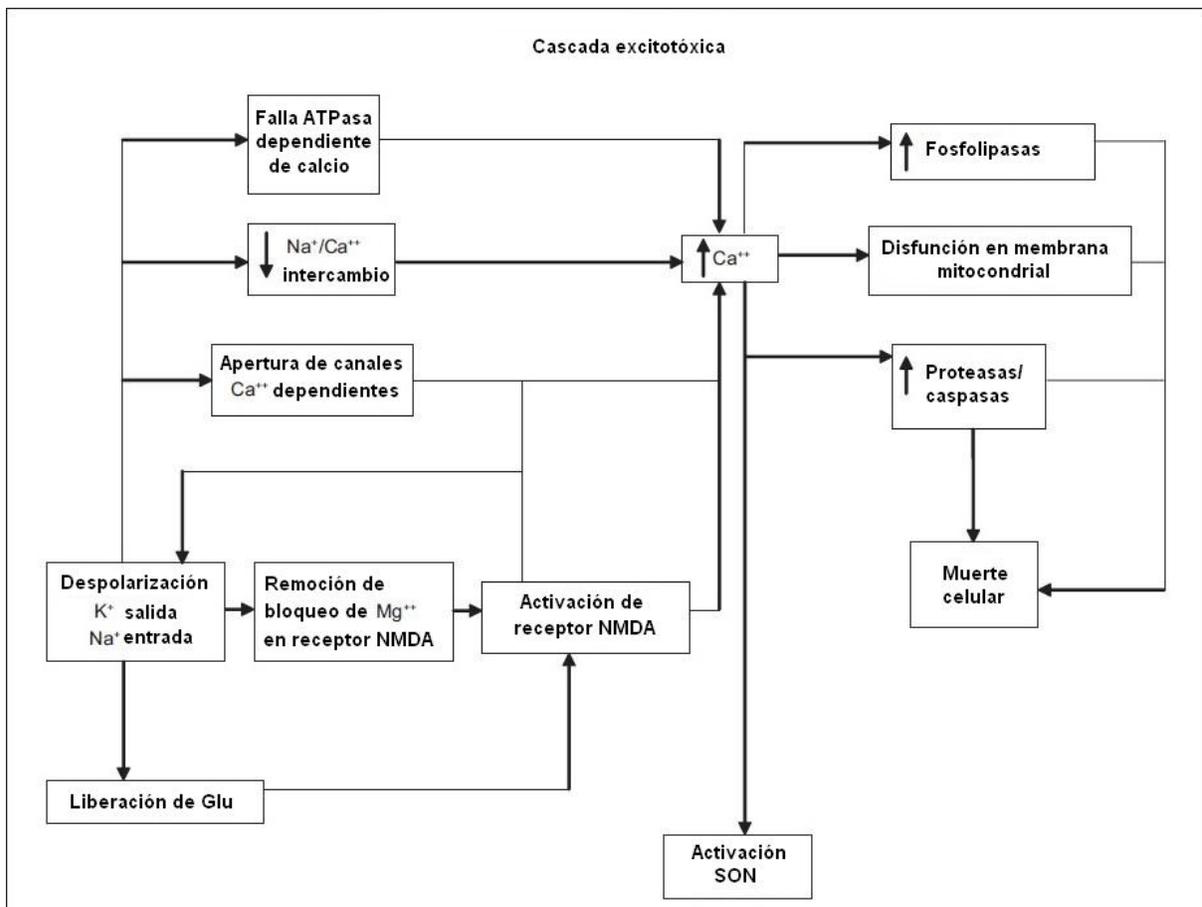


Figura 4. Cascada excitotóxica [24].

1.4. ÁCIDO QUINOLÍNICO

1.4.1 Generalidades

El ácido quinolínico (QUIN) es un intermediario en la vía metabólica de las kinureninas que convierte al triptófano en los cofactores esenciales ácido nicotínico y dinucleótido de nicotinamida adenina (Fig. 5). Aunque permaneció hasta el año de 1981 como un metabolito inactivo del triptófano, la relevancia de su papel fisiológico y farmacológico se determinó al descubrirse que podía activar selectivamente el subtipo de receptores ionotrópicos de glutamato sensibles al NMDA [25, 26].

El QUIN proviene de la conversión del 3-hidroxiantranilato (3-HANA) por la enzima 3-hidroxiantranilato-3,4-dioxigenasa (3-HAO). Dicha enzima cataliza la reacción del 3-HANA en 2-amino-3-carboximuconato-6-semialdehído (ACMS), el cual a su vez se convierte en su mayoría a QUIN, por un proceso no enzimático de ciclación, aunque una pequeña fracción se convierte en ácido picolínico [26, 27].

La concentración reportada de QUIN en el tejido cerebral mamífero sano, se encuentra entre los 50 y 100 nM, mientras que en líquido cefalorraquídeo su concentración es de 10-35 nM. Su presencia en el tejido cerebral humano y de rata fue demostrada a principios de los años 80 por Wolfensberg et al., (1983), mediante la conversión del QUIN prepurificado a dihexafluoropropil ester y el posterior análisis de sus fragmentos utilizando la técnica de espectroscopía de masas [28, 29].

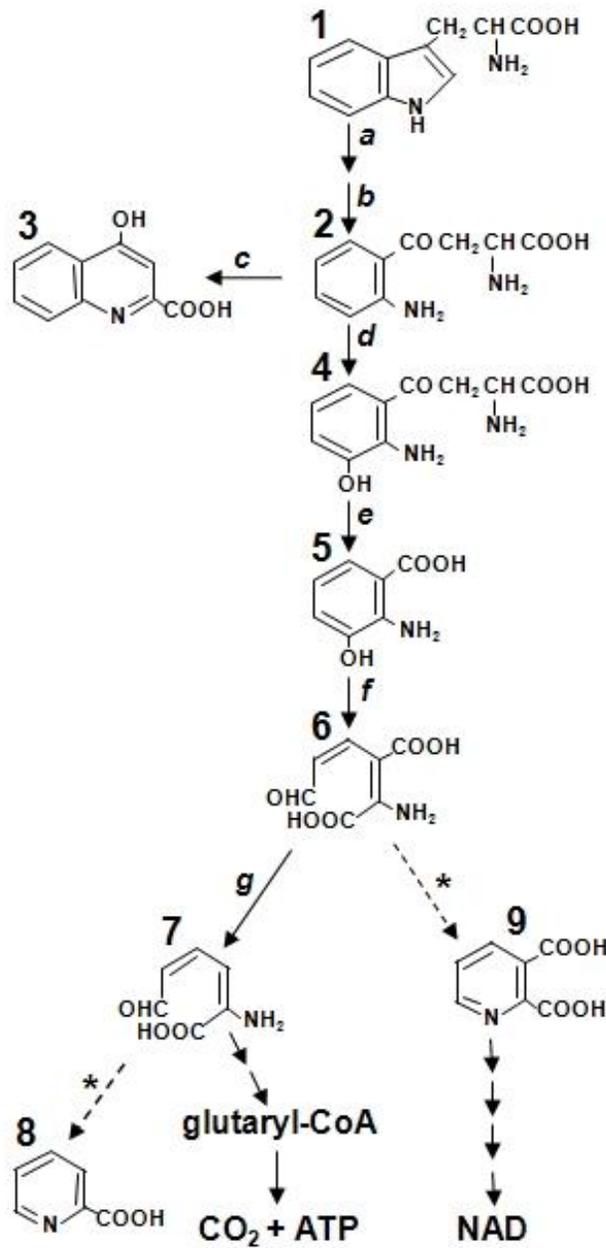


Figura 5. Esquema del catabolismo del triptófano mediante la vía de las kinureninas. Los números indican los intermediarios de la vía: (1); L-kinurenina (2); ácido kinurénico (3); 3-hidroxi-kinurenina (4); 3-hidroxi-antranilato (5); 2-amino-3-carboximuconato-6-semialdehído (ACMS) (6); 2-aminomuconato-6-semialdehído (AMS) (7); picolinato (8); ácido quinolínico (QUIN) (9). La fuente itálica señala las enzimas de la vía: triptófano/indolamino-2,3-dioxigenasa (a); kinurenina-formamidasa (b); kinurenina-aminotransferasa (c); kinurenina-3-hidroxilasa (d); kinureninasa (e); 3-hidroxi-antranilato-3,4-dioxigenasa (f); 2-amino-3-carboximuconato-6-semialdehído-descarboxilasa (g). Flecha con línea punteada y marcadas con asteriscos indican las 2 reacciones no enzimáticas que conducen a la síntesis de ácido quinolínico y picolinato [30].

1.4.2. Ácido quinolínico y procesos patológicos

Existe evidencia de que en seres humanos las concentraciones de QUIN se encuentran alteradas en diversos procesos patológicos. En tejido cerebral y LCR obtenidos *post-mortem* de pacientes que padecen procesos inflamatorios (septicemia, meningitis, enfermedades autoinmunes o infecciones por virus, bacterias o parásitos), existen concentraciones elevadas de QUIN, llegando en algunos casos como en aquellos pacientes con síndrome de inmunodeficiencia (SIDA) y pacientes con lesión traumática a encontrarse entre 5 y 40 veces más elevado [26, 31, 32].

1.4.3. Ácido quinolínico como agonista NMDA

En 1981 Stone y Perkins demostraron el potencial excitatorio del QUIN al actuar como un agonista selectivo de los receptores NMDA en neuronas corticales de cerebro de rata. La administración de QUIN en el tejido estriado permitió caracterizar lesiones que dejaban intacto el axón neuronal y sus terminales presinápticas, pero con el hinchamiento de dendritas y la pérdida de la estructura celular en las terminales postsinápticas, dejando a la glía sin pérdida significativa [25, 33].

Schwarcz y Kohler (1983) caracterizaron el daño en el tejido estriatal a dosis tan bajas como 12 nM de QUIN inyectado y encontraron diferencia en la sensibilidad al daño ocasionado por dicha molécula en diferentes áreas de tejido cerebral, siendo el hipocampo y el tejido del cuerpo estriado los más sensibles a la neurotoxicidad producida, demostrando la existencia de diferentes subtipos en los receptores NMDA y su distribución en el cerebro [33, 34].

En las áreas más sensibles al daño por QUIN, existen células neuronales más propensas al daño que otras. En el hipocampo, las células más susceptibles son las piramidales, mientras que en el cuerpo estriado, las más sensibles son las neuronas de naturaleza colinérgica y las neuronas espinosas medianas que poseen el neurotransmisor ácido γ -aminobutírico (GABA) y el péptido sustancia P, mientras que aquellas neuronas no espinosas que

contienen la hormona somatostatina y el neuropéptido “Y”, son preservadas tras inducir la lesión con QUIN [35].

El QUIN actúa selectivamente en el receptor NMDA, específicamente en aquellos receptores que cuentan con las subunidades NR2A y NR2B, las cuales permiten la entrada masiva de calcio, por lo que las neuronas en las que dichas subunidades se encuentran presentes, son aquellas en las que el QUIN provoca mayor daño [36]. En ratas, la administración intraestriatal de QUIN produce en los minutos posteriores a la lesión, movimientos característicos de torsión involuntarios [37, 38].

Kohler (1988) demostró que la acumulación de QUIN después de la estimulación de la vía de las kinureninas, se debe a la menor existencia de células que contienen a la enzima quinolato fosforibosiltransferasa (QPRT), la cual transforma metabólicamente al QUIN en ácido ribonucleótido nicotínico para su posterior paso a dinucleótido de nicotinamida adenina, en comparación con las células que poseen a la 3-HAO, la cual sintetiza QUIN. Además en aquellas células que poseen QPRT, las cuales son de naturaleza glial principalmente, la enzima se encuentra almacenada en cuerpos citoplasmáticos lo que impide el acceso del QUIN para su metabolismo [39].

1.4.4. Ácido quinolínico y excitotoxicidad

La excitotoxicidad inducida por el QUIN provoca una sobre-activación de los receptores NMDA, lo que permite una entrada excesiva de iones de Ca^{2+} . La disfunción mitocondrial, la cual es un evento crítico en la cascada de muerte celular por apoptosis, se ha comprobado a partir de la demostración de una reducción en el consumo de oxígeno por la mitocondria y una disminución en sus niveles de ATP después de la administración intraestriatal de la neurotoxina. Dicha reducción energética pudiera ser explicada por la producción de radicales libres generados a partir del aumento intramitocondrial de Ca^{2+} [40, 41].

La concentración tóxica de QUIN necesaria para provocar la muerte neuronal en tejido cerebral humano en cultivo es de 5 nM, con una exposición del tejido durante 20 horas.

Aunque el aumento en los niveles de QUIN está asociado a diferentes patologías neurológicas de carácter inflamatorio, las concentraciones de dicho metabolito endógeno en LCR son muy bajas en comparación a las utilizadas para caracterizar daño neuronal en experimentos *in vitro* [42]. Sin embargo, está documentado que dosis bajas de QUIN resultan tóxicas cuando la exposición neuronal es de naturaleza crónica. *In vitro*, dosis tan bajas como 1 μM en células corticales incluyendo neuronas y glía muestran signos de toxicidad en un periodo de 72 horas. Cultivos neuronales obtenidos a partir del sistema corticoestriatal de rata, muestran daño por excitotoxicidad al ser expuestas durante un periodo de 7 semanas al QUIN a una concentración de 100 nM [43, 44].

La potencia como excitotoxina del QUIN en modelos *in vivo* no puede ser enteramente explicada por la sobre-activación de los receptores NMDA, la cual puede estar ocasionada por la alta concentración de la excitotoxina en la sinapsis o bien por la falta de una remoción adecuada del QUIN extracelular [45, 46]. La alta capacidad del QUIN para generar radicales libres que pueden generar daño oxidante fue demostrada experimentalmente por Santamaría y Ríos (1993, 1991) mediante la determinación de la peroxidación lipídica en homogenados de tejido cerebral de ratas incubados con QUIN a concentraciones entre 20 y 80 μM , observando un aumento de hasta casi el 50% con respecto al grupo control. Adicionalmente en experimentos *in vivo* en los cuales se administró el QUIN intraestriatalmente, la peroxidación lipídica y el daño neuronal se incrementaron de manera significativa con respecto al grupo control y al grupo al que se le co-administró el antagonista de los receptores NMDA, MK-801 [47, 48].

La reducción dosis-dependiente en el nivel de glutatión reducido (GSH) y el incremento en su forma oxidada de disulfuro (GSSG) después de la administración intraestriatal de QUIN en dosis de 60-480 nM/ μL , se encuentra reportada en la literatura por Rodríguez-Martínez et al., (2000). Sin embargo, experimentos *in vitro* realizados en corteza de rata, lograron definir que dicha oxidación no sucede por mecanismos enzimáticos, ya que la actividad de la glutatión peroxidasa no se encuentra modificada después de la lesión con QUIN, lo cual confirma una disminución en las defensas antioxidantes que son ajenas a los sistemas enzimáticos por parte de la neurotoxina [49, 50].

El QUIN no posee un efecto pro-oxidante por sí mismo, sin embargo, es capaz de modular la peroxidación lipídica por vía de la interacción con iones Fe^{2+} , lo cual fue demostrado por el trabajo de Stipek et al., (1997), quienes observaron el aumento en la peroxidación en homogenados de tejido cerebral de rata al aumentar la concentración de iones ferrosos, con una completa inhibición del efecto oxidante al agregar a las preparaciones el quelante de hierro deferoxamina [51].

1.5. DAPSONA (DDS)

1.5.1. Características físicoquímicas

Nombre químico: 4,4'-diaminodifenilsulfona

Fórmula molecular: $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$

Fórmula estructural: Ver figura 6.

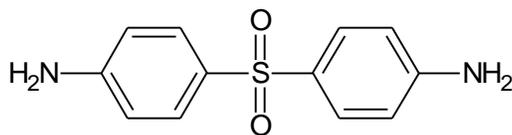


Figura 6. Estructura de la 4,4'-diaminodifenilsulfona

Peso molecular: 248.30 g/mol

Características físicas: Polvo cristalino blanco o amarillo pálido sin olor detectable.

Punto de fusión: 175-176°C (Existen formas cristalinas con un punto de fusión de 180-181°C)

Solubilidad: Prácticamente insoluble en agua, ligeramente en etanol y muy soluble en disolventes orgánicos como acetona y acetonitrilo

P_{kb}: 13.0

Características especiales: Molécula fotosensible

1.5.2. Usos terapéuticos

La 4,4'-diaminodifenilsulfona o dapsona (DDS), fue sintetizada por primera vez por Fromm y Wittmann en el año de 1908. Su síntesis no tuvo su origen en la búsqueda de nuevas entidades con propiedades terapéuticas, sino en el interés por encontrar moléculas para la producción de colorantes azoicos.

La DDS es un agente bacteriostático efectivo contra los géneros *Streptococci*, *Staphylococci*, *Gonococci*, *Pneumococci* y *Micobacterium* cuyo mecanismo es el mismo por el cual los fármacos que pertenecen a la familia de las sulfonamidas ejercen su acción como antibióticos, actuando como análogos estructurales y antagonistas del ácido para-aminobenzoico (PABA), lo que convierte a la DDS en un inhibidor competitivo de la dihidropteroato sintetasa, enzima bacteriana que incorpora el PABA al ácido dihidropteroico, el cual es precursor inmediato del ácido fólico necesario para la síntesis de su pared celular [52].

Actualmente, la DDS ha cobrado suma importancia como una terapia farmacológica coadyuvante efectiva en el control de infecciones concomitantes en pacientes que padecen el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), como por ejemplo la neumonía por *Pneumocystis carinii*, la toxoplasmosis y la infección por *Micobacterium tuberculosis* [53-56].

El uso de la DDS en el tratamiento de diversos desórdenes dermatológicos como la dermatitis herpetiforme, el pénfigo vulgar, la pioderma gangrenosa o en lesiones producidas por la mordida de la “araña reclusa café” está sustentado principalmente en la capacidad terapéutica que tiene dicha molécula para actuar como un agente anti-inflamatorio [57, 58].

Diversos trabajos experimentales han documentado los mecanismos de la DDS como un agente anti-inflamatorio, entre los que se encuentran: la capacidad para inhibir la unión de leucotrieno B₄ a neutrófilos, disminuyendo en consecuencia de manera dosis dependiente,

su respuesta quimiotáctica, y la inhibición en la síntesis de productos de la 5-lipooxigenasa (prostaglandinas y leucotrienos) en leucocitos polimorfonucleares, bloqueando por consecuencia su efecto inflamatorio. Existen reportes del mecanismo por el cual la DDS es capaz de inhibir de manera local y específica la actividad de los neutrófilos en el lugar de la lesión. Dicho mecanismo, se encuentra directamente relacionado con su capacidad de inhibir las lesiones mediadas por los productos oxidantes de las enzimas mieloperoxidasa y eosinofiloperoxidasa en aquellos sitios donde estas enzimas son secretadas y diluidas en el espacio intersticial tisular [59-63].

1.5.3. Farmacocinética y distribución

En humanos, la DDS es absorbida rápidamente y de forma casi completa (86%) después de su administración oral. Dos a ocho horas después de su ingesta, se detecta la concentración máxima (1.10 – 2.33 µg/mL) y su vida media de eliminación es de 12-30 horas. En promedio, aproximadamente un 70% del fármaco se une a proteínas y se distribuye a todos los órganos incluyendo: piel, hígado, riñones y eritrocitos. La DDS es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica y puede detectarse en leche materna [64-67].

1.5.4. Metabolismo y excreción

De manera posterior a su absorción por vía del tracto gastrointestinal, la DDS se transporta a través de la circulación portal al hígado, donde es metabolizada principalmente por dos vías; la acetilación por medio de la N-acetiltransferasa, produciendo los metabolitos monoacetildapsona y en mucha menor cantidad la diacetildapsona y la N-hidroxilación. Se encuentra reportado que varias subfamilias del citocromo participan en la conversión metabólica de la DDS entre las cuales se encuentran CYP2E1, CYP2C9 y en mucha menor cantidad CYP3A1. El metabolito N-hidroxilado de la DDS está directamente relacionado con el efecto adverso más importante del fármaco por tener la capacidad de oxidar a la hemoglobina (Hb). El metabolito N-hidroxilado es además poco estable y muy reactivo, por lo que tiene una vida media muy corta, haciéndolo difícil de determinar en los fluidos biológicos. [58, 68-72].

Casi el 85% de la DDS es excretada por vía de la orina y cerca del 10% por vía biliar. El fármaco se elimina en forma de mono-N-glucurónido lábil a pH ácido y como mono-N-sulfamato, además de varios metabolitos no identificados. El 50% de una dosis única de DDS es eliminada dentro de las 24 horas posteriores a su administración [68, 73].

1.5.5. Dapsona como anticonvulsivante y neuroprotector

En el año de 1990, el efecto anticonvulsivante de la DDS en modelos agudos experimentales, fue reconocido por el Programa de Desarrollo de Fármacos Anticonvulsivantes del Instituto Nacional de Desórdenes Neurológicos de los Estados Unidos de Norteamérica, al demostrar la modificación del patrón de crisis máximas desencadenadas por electroshock (MES) en ratas a dosis no tóxicas (16 mg/kg), sin embargo, no se logró ningún efecto benéfico en el modelo de crisis provocadas por pentilentetrazol utilizando el fármaco inclusive a dosis tóxicas.

Hamada et al., (1991) probaron las propiedades anticonvulsivantes de la DDS en un modelo de kindling amigdalino realizado en ratas y gatos utilizando dosis de 6.25-12.5 mg/kg y 13-23 mg/kg respectivamente, logrando la supresión dosis-dependiente de las crisis. Aunque no se observaron signos de toxicidad evidente en las ratas después de la administración única del fármaco por vía intraperitoneal, en los gatos, los cuales recibieron dosis orales repetidas, la concentración terapéutica se traslapó con niveles tóxicos del fármaco llegando a los 20 µg/mL en suero. Sin embargo, la supresión de las crisis se mantuvo en los gatos después de discontinuar la administración de la DDS [74].

Debido a que las dosis de DDS para el tratamiento de la lepra a largo plazo en humanos se encuentran bien establecidas, Ishida et al., (1992), continuaron con las investigaciones acerca de las posibles propiedades anticonvulsivantes del fármaco en modelos de kindling amigdalino e hipocampal en ratas Wistar macho adultas, logrando respectivamente, una inhibición completa de la post-descarga en el 60% y 74% de las ratas evaluadas, utilizando dosis entre los 9.37 y 12.5 mg/kg del fármaco [75].

En consecuencia a los resultados positivos obtenidos en los estudios de Hamada e Ishida et al., (1991,1992), otros modelos de crisis convulsivas fueron utilizados en la evaluación del efecto anticonvulsivante de la DDS. Ríos et al., (1993), Altagracia et al., (1994) y García-Arenas et al., (1997) demostraron resultados positivos en el uso de la sulfona al disminuir las crisis convulsivas generadas por la administración de ácido kaínico en ratas Wistar, llevando a cabo el registro encefalográfico y de las crisis parciales en forma de “sacudida de perro mojado”, así como de la mortalidad en el modelo experimental. Los resultados de dichos estudios mostraron una disminución en el registro encefalográfico de las crisis de hasta en un 82% con respecto al grupo control y disminuciones de más del 62 y el 60% en la aparición de crisis parciales y en la mortalidad del modelo respectivamente [76, 77].

La efectividad de la DDS como un agente anticonvulsivante en el modelo de ácido kaínico, el cual es un agonista selectivo de un subtipo de receptores iónotrópicos que son activados por glutamato y puede ocasionar daño y muerte neuronal por la activación de mecanismos vinculados al aumento intracelular de Na^+ y Ca^{2+} , condujo a la posterior evaluación de la DDS como un agente neuroprotector. Entre los modelos de daño neuronal provocado por excitotoxicidad en los que la DDS ha sido evaluada, se encuentra el modelo de administración intraestriatal de ácido quinolínico (QUIN), el cual produce la sobre-activación específica de los receptores NMDA [78].

Santamaría et al., (1997), caracterizaron el efecto neuroprotector de la DDS al reportar protección contra los giros ipisilaterales provocados por una lesión estriatal unilateral generada por la administración de 1 μL de QUIN (240 nM) en ratas Wistar macho adultas, logrando una disminución en el número de giros del 52% y del 62% con respecto al grupo control de daño, utilizando dosis de DDS de 12.5 y 25 mg/kg respectivamente. Además encontraron una conservación significativa en el contenido intraestriatal de GABA, disminuyendo solamente en el caso de los animales que recibieron la dosis de 25 mg/kg en un 1% con respecto al grupo control de daño, al cual se le administró únicamente el QUIN presentando una disminución de hasta un 59% en el contenido del aminoácido al ser comparado con el grupo testigo [79].

El efecto protector de la DDS contra otros marcadores de daño asociados a la sobre-activación de receptores NMDA se encuentra documentado en el trabajo de Rodríguez et al., (1999). Dicho estudio logró determinar que el fármaco administrado a dosis de 12.5 y 25 mg/kg, atenuaba de manera significativa el daño asociado al estrés oxidante derivado de la administración intraestriatal de QUIN, al encontrar una disminución significativa del daño morfológico y una reducción de la peroxidación lipídica de hasta un 78% a las dos horas después de la lesión con respecto al grupo control de daño. De acuerdo a los autores, dicha protección, podría estar relacionada con la capacidad de la DDS para actuar como un agente antioxidante mediante la inhibición de los sistemas citotóxicos de los neutrófilos basados en la actividad de la mieloperoxidasa y en la producción de peróxido de hidrógeno. La capacidad de la DDS para disminuir el daño inflamatorio actuando como un atrapador de especies reactivas de oxígeno, también se encuentra documentado en la literatura [80-82].

1.5.6. Análogos de dapsona y neuroprotección

Aunque una gran cantidad de análogos de la DDS se han sintetizado con la finalidad de aumentar su actividad bacteriostática y disminuir su hematotoxicidad, en pocos trabajos se ha llevado a cabo la evaluación de la actividad anticonvulsivante y neuroprotectora de los derivados de esta sulfona. En estudios experimentales como los de Kravzov et al., (1996), Altagracia et al., (1998) y López-Naranjo et al., (2003), se evaluó la eficacia de varios análogos, incluyendo moléculas previamente reportadas en la literatura para el tratamiento de la lepra, como la diasona (sulfóxido del 4,4'-diaminodifenilsulfona-N,N'-diformaldehído de sodio), la glucosulfona (sulfonato de sodio del 4,4'-diaminodifenilsulfona-N,N'-didextrosa), los metabolitos mono y diacetilados de la DDS e incluyeron adicionalmente el dibisulfito de sodio de la 4,4'-biscinamilidenaminodifenilsulfona y dos análogos N,N'-dialquilados de la molécula original (N,N'-dimetil-4,4'-diaminodifenilsulfona y la N,N'-dietil-4,4'-diaminodifenilsulfona).

Aunque análogos como la acedapsona (metabolito diacetilado de la dapsona), la glucosulfona y la biscinamilidendapsona demostraron disminuir significativamente de

manera dosis-dependiente la frecuencia de las sacudidas de cabeza y cuerpo provocadas por la administración de ácido kaínico, la N,N'-dimetil-4,4'-diaminodifenilsulfona (N,N'-dimetildapsona) protegió hasta en un 71% contra la postdescarga de las crisis límbicas generadas por la administración de ácido kaínico, reduciendo el tiempo de la primera crisis de origen límbico e incrementando el tiempo de latencia, duplicando así el efecto protector máximo de la DDS en el mismo modelo con dosis relativamente bajas del análogo N,N'-dialquilado (3.25-6.25 mg/kg) [83-85].

1.5.7. Efectos adversos de la dapsona

1.5.7.1. Metahemoglobinemia y anemia hemolítica

El uso de la DDS se encuentra limitado por las reacciones adversas de naturaleza hematológica que se presentan de manera dosis-dependiente, incluso a dosis terapéuticas. Pacientes con una deficiencia genética, que carecen de la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PD), deben ser monitoreados durante el tiempo que dure el tratamiento. El efecto adverso más común es la metahemoglobinemia, la cual es significativa a la dosis de 100 mg en pacientes fenotípicamente normales y es severa en aquellos con una deficiencia de la metahemoglobina-reductasa dependiente de NADH. La aparición de metahemoglobinemia y anemia hemolítica ocurre en cierto grado en todos los individuos que reciben el fármaco. Sin embargo existe una variabilidad significativa en el grado e importancia de los cambios hematológicos [86].

Como se mencionó anteriormente, la hematotoxicidad de la DDS está directamente relacionada con la formación de metabolitos N-hidroxilados del fármaco, dichos metabolitos, además de sintetizarse mediante la participación de varias familias del citocromo P450, son producidos por otras enzimas hepáticas, como la flavin-monooxigenasa y la sintetasa de la prostaglandina H. Adicionalmente, la N-hidroxilación de la DDS se encuentra caracterizada de manera periférica por acción de la mieloperoxidasa de los leucocitos polimorfonucleares [86-88].

Los metabolitos hidroxilados de la DDS (N-hidroxildapsona y N-acetil-hidroxildapsona) son potentes agentes oxidantes y su capacidad para auto-reducirse fácilmente, hacen que

una sola molécula de N-hidroxildapsona pueda oxidar hasta 160 moléculas de hemoglobina. El mecanismo por el cual los eritrocitos pueden amortiguar los efectos del estrés oxidante generado por tales metabolitos se encuentra relacionado con el reabastecimiento de glutatión reducido y con la incorporación en la vía de las hexosas monofosfato para reducir la hemoglobina, reparando así el daño oxidante [68, 87, 89].

Debido a que los eritrocitos no pueden realizar la síntesis de proteínas, su habilidad para soportar el estrés oxidante de los metabolitos hidroxilados de la DDS decrece con el tiempo, dejando de amortiguar la acción de especies oxidantes y de los radicales tiilo del glutatión y de la hemoglobina formados a consecuencia del daño oxidante. Dicha incapacidad, conduce a la formación de aductos entre la hemoglobina y la proteínas citoesqueléticas del eritrocito, modificando así sus propiedades estructurales y de fluidez membranal, por lo que a su paso por el bazo, es destruido [90-92].

La susceptibilidad a los eventos adversos de naturaleza hematológica se encuentra aumentada en aquellos individuos que padecen una deficiencia en la enzima glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa. Dicha deficiencia resulta en una alteración del uso de la desviación de la hexosa monofosfato y en una disminución del abastecimiento de glutatión. El mecanismo de este efecto adverso se muestra en la figura 7.

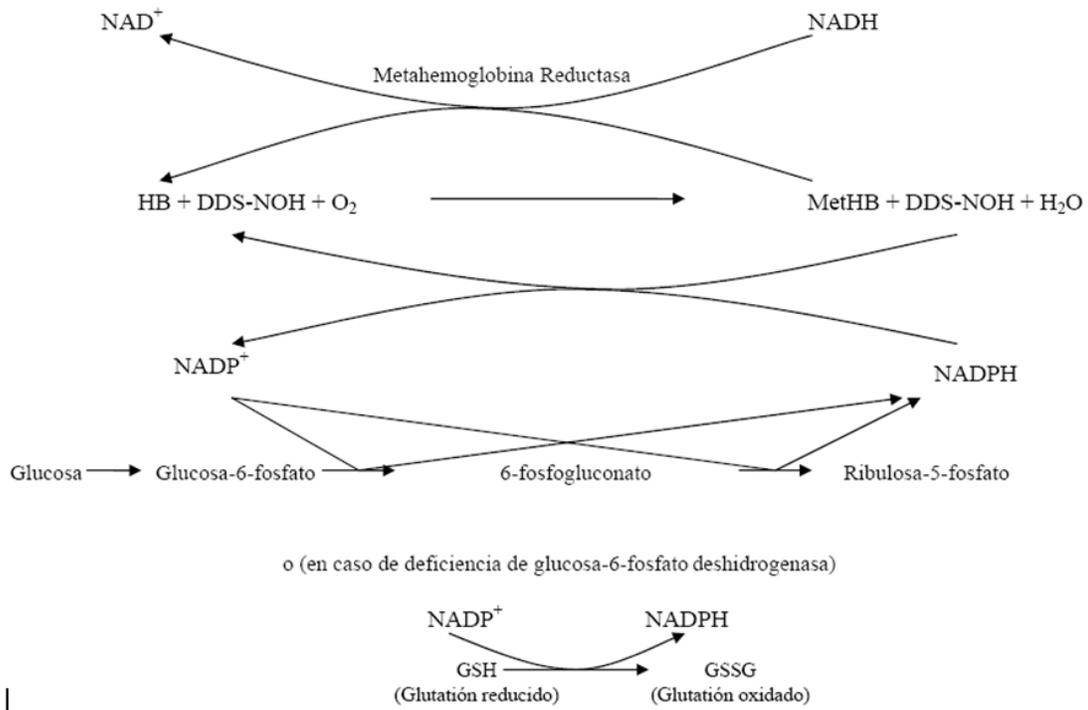


Figura 7. Formación de metahemoglobina en sujetos normales y deficientes de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa [68].

El efecto adverso más importante después de la anemia hemolítica es la metahemoglobinemia. La metahemoglobina es formada, cuando el hierro que se encuentra en la estructura hemo es oxidado a su estado férrico por los metabolitos N-hidroxilados de la DDS. La reversión a estado ferroso, requiere de glutatión reducido y de la acción enzimática de la metahemoglobina reductasa [69, 91].

La metahemoglobina no tiene la capacidad de transportar oxígeno y cuando alcanza concentraciones mayores al 30% en individuos normales existe un impacto sobre el sistema fisiológico que lleva a cabo el abastecimiento de oxígeno. La importancia clínica de la metahemoglobinemia en un paciente se encuentra relacionada con su nivel de hemoglobina y su reserva cardiopulmonar. Los principales síntomas y signos de toxicidad incluyen: somnolencia, dolor de cabeza, disnea y la aparición de cianosis [52, 93].

Para disminuir la hemólisis y los niveles de metahemoglobinemia en pacientes a los cuales se les administra DDS, se han utilizado diversas estrategias como la administración de 800 UI/día de vitamina E como agente antioxidante, la coadministración de cimetidina para inhibir la N-hidroxilación de la DDS, y en casos de metahemoglobinemia severa la administración oral de azul de metileno (100-300 mg/día o bien 1mg/kg por vía intravenosa en 5 minutos con repeticiones hasta la normalización del nivel de hemoglobina). La administración de azul de metileno se realiza con la finalidad de estimular la activación de la metahemoglobina reductasa dependiente de NADH. Dicha vía de reducción, requiere de la actividad de la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, por lo que aquellos individuos con una deficiencia de esta enzima, no responden al tratamiento [94-96].

1.5.7.2. Efectos adversos idiosincrásicos

Los mecanismos de los efectos adversos idiosincrásicos de la DDS se hallan poco estudiados por lo que su comprensión es menor a los efectos adversos farmacológicos. Estos efectos no son dependientes de la dosis y no existe un criterio clínico para predecir su desarrollo. Entre los más comunes se encuentran: dolor de cabeza, agranulocitosis, neuropatía, erupciones cutáneas, además de algunos trastornos neurológicos y gastrointestinales que son muy poco frecuentes [97-100].

1.5.7.3. Análogos de dapsona y metahemoglobinemia

Existe una gran cantidad de reportes en la literatura acerca de estudios realizados *in vitro* utilizando microsomas de rata o humanos en incubación, cuya finalidad es la de comparar el efecto hematotóxico de diversos análogos estructurales de la DDS con respecto a la molécula original. En dichos estudios se han aplicado diferentes estrategias para la síntesis orgánica de las moléculas propuestas, modificando la posición de los grupos amino en los anillos aromáticos de la molécula, añadiendo grupos funcionales y variando su posición en la estructura diaminodifenilo [101-103].

Aunque muchas de las moléculas diseñadas por diferentes grupos de investigación han demostrado un perfil toxicológico favorable, resulta de particular interés para nuestro trabajo el antecedente experimental de Coleman et al., (1999), cuyo grupo sintetizó una

serie de 29 análogos de la DDS para llevar a cabo un análisis estructura/toxicidad-actividad (QSAR). En dicho estudio, algunos compuestos N,N'-dialquilados, entre los cuales se encontraba la molécula N,N'-dimetilada, disminuyeron hasta en un 80 por ciento el porcentaje de metahemoglobina producido en comparación con incubaciones microsomales hechas en presencia de DDS únicamente. En curvas dosis-respuesta elaboradas incubando los microsomas en presencia de una mezcla de diferentes proporciones de DDS y del análogo N,N'-dimetilado, se encontró que a mayores concentraciones de DDS, la formación de hemoglobina era inhibida por la presencia de la N,N'-dimetildapsona, lo cual podría indicar que el metabolismo del grupo amino primario de la DDS y el del grupo amino secundario del análogo estaría siendo catalizado por la misma enzima [104]

2. JUSTIFICACIÓN

La excitotoxicidad por glutamato es un proceso patológico involucrado en diferentes enfermedades neurológicas y crónico-neurodegenerativas que tienen una alta prevalencia en México y el mundo como lo son: la epilepsia, los traumatismos, los accidentes cerebrovasculares y la enfermedad de Huntington entre otras; dichos padecimientos requieren de nuevas opciones y estrategias de terapia farmacológica para su tratamiento.

El presente trabajo tiene como uno de sus objetivos corroborar el amplio potencial terapéutico de la dapsona en condiciones clínicas que generan excitotoxicidad por glutamato. Además, con base en el antecedente experimental de López-Naranjo et al. (2003), quienes encontraron efecto anticonvulsivante en el derivado N,N'-dimetilado de la dapsona en el modelo de crisis provocadas por el agonista de glutamato, ácido kaínico, proponemos la obtención y caracterización estructural de cuatro derivados N,N'-dialquilados, con la finalidad de aumentar el paso del fármaco a través de la barrera hematoencefálica y disminuir los efectos adversos asociados a la formación de metabolitos N-hidroxilados, como se ha demostrado en el caso de los análogos N,N'-dimetilado y N,N'-dietilado en modelos *in vitro*.

3. HIPÓTESIS

La adición simétrica de sustituyentes alquilo a los grupos amino de la 4,4'-diaminodifenilsulfona aumentará su efecto como agente neuroprotector, además de reducir su hematotoxicidad al inhibir la formación de metabolitos N-hidroxilados.

4. OBJETIVOS

4.1. GENERAL

Sintetizar cuatro análogos N,N'-dialquilados de la 4,4'-diaminodifenilsulfona, evaluar su actividad neuroprotectora en un modelo experimental de neuroexcitotoxicidad por ácido quinolínico en ratas Wistar macho adultas y determinar sus principales parámetros de toxicidad hemática.

4.2. PARTICULARES

- Obtener y caracterizar fisicoquímica y estructuralmente una serie análoga con los siguientes cuatro derivados de la 4,4'-diaminodifenilsulfona:
 - N,N'-dimetil-4,4'-diaminodifenilsulfona
 - N,N'-dietil-4,4'-diaminodifenilsulfona
 - N,N'-dipropil-4,4'-diaminodifenilsulfona
 - N,N'-dibutil-4,4'-diaminodifenilsulfona

- Evaluar el efecto neuroprotector de los compuestos obtenidos mediante una prueba de conducta de giro, y la determinación del contenido estriatal de GABA en el modelo de neuroexcitotoxicidad por inyección intraestriatal de ácido quinolínico en ratas Wistar macho adulto.

- Determinar la toxicidad hemática de los análogos propuestos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. REACTIVOS

- Síntesis orgánica

4,4'-diaminodifenilsulfona $\geq 97.0\%$ (Aldrich, E.U.A.)

Acetato de etilo 99.6% (J.T. Baker, México)

Ácido clorhídrico 36.5-38.0% (J.T. Baker, México)

Ácido sulfúrico 95.0-98.0% (J.T. Baker, México)

Bromuro de butilo $\geq 99.0\%$ (Sigma-Aldrich, E.U.A.)

Bromuro de etilo $\geq 99.0\%$ (Sigma-Aldrich, E.U.A.)

Bromuro de propilo $\geq 99.0\%$ (Sigma-Aldrich, E.U.A.)

Carbonato de potasio 99.9% (Merck, Alemania)

Cloroformo 99.9% (Técnica Química, México)

Cloruro de tosilo $\geq 99.0\%$ (Sigma-Aldrich, E.U.A.)

Dimetilformamida $\geq 99.8\%$ (J.T. Baker, México)

Hexano 95% (Técnica Química, México)

Hidróxido de amonio 28.0-30.0% (J.T. Baker, México)

Ioduro de metilo $\geq 99.0\%$ (Sigma-Aldrich, E.U.A.)

Piridina $\geq 99.0\%$ (J.T. Baker, México)

- Evaluación farmacológica, toxicológica y análisis cromatográfico

Acetonitrilo $\geq 99.8\%$ (Mallinckrodt Chemicals, México)

Ácido acético glacial $\geq 99.5\%$ (J. T. Baker, México)

Ácido quinolínico 99.0% (Sigma-Aldrich, E.U.A.)

Ácido β -mercaptopropiónico $\geq 99.0\%$ (Sigma-Aldrich, E.U.A.)

Ácido γ -aminobutírico $\geq 99.0\%$ (Sigma-Aldrich, E.U.A.)

Cianuro de potasio $\geq 98.0\%$ (Técnica Química, México)

Clorhidrato de apomorfina $\geq 98.0\%$ (ICN Biomedicals INC, E.U.A.)

Dimetilsulfóxido 99.9% (J.T. Baker, México)

Ferrocianuro de potasio $\geq 98.0\%$ (Sigma, E.U.A.)

Pentobarbital sódico 63 mg/mL (Anestosal-Pfizer, México)

Saponina 8-25% (Sigma-Aldrich, E.U.A.)

Solución salina fisiológica (Pisa, México)

5.2. SÍNTESIS ORGÁNICA

Obtención de los análogos propuestos de la 4,4'-diaminodifenilsulfona

La síntesis orgánica de los cuatro análogos propuestos de la 4,4'-diaminodifenilsulfona, se realizó en tres etapas.

5.2.1. N,N'-ditosilación de los grupos amino de la 4,4'-diaminodifenilsulfona

Se disolvieron 0.025 moles de 4,4'-diaminodifenilsulfona en 25 mL de piridina seca y a la solución resultante se le añadió gota a gota una solución de 0.053 moles de cloruro de tosilo también disueltos en piridina. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 24 horas (Fig. 8) [105]. Posteriormente se añadieron 150 mL de agua y se filtró el sólido resultante, lavándolo abundantemente con agua y posteriormente con acetato de etilo. La purificación del compuesto se realizó mediante cromatografía en columna de sílica gel con una fase móvil de hexano-acetato de etilo 6:4.

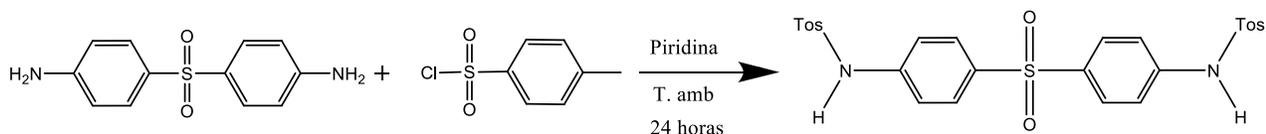


Figura. 8. Reacción de la N,N'-ditosilación de la 4,4'-diaminodifenilsulfona.

5.2.2. N,N'-dialquilación de los grupos amino del intermediario N,N'-ditosilado de la 4,4'-diaminodifenilsulfona

Se disolvieron 3.6 mmoles de N,N'-ditosil-4,4'-diaminodifenilsulfona en 25 mL de dimetilformamida y se mezclaron con 8.28 mmoles de carbonato de potasio previamente disueltos en 5 mL de agua. A la mezcla obtenida se le adicionaron 10.3 mmoles del haluro de alquilo correspondiente al sustituyente deseado (yoduro de metilo, bromuro de etilo, bromuro de *n*-propilo o bromuro de *n*-butilo) y se llevó a reacción a 85 °C en un sistema de microondas Discover (CEM) a 100 watts de potencia durante 60-120 minutos de acuerdo al

haluro de alquilo (ciclos de 20 minutos) (Fig. 9). La mezcla de reacción resultante se extrajo en un sistema de acetato de etilo-agua. Posteriormente la fase orgánica se evaporó y el producto se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice con una fase móvil de cloroformo-acetato de etilo 95:5.

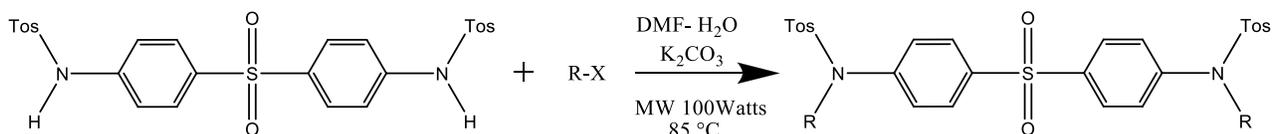


Figura. 9. Reacción de N,N'-alquilación del compuesto ditosilado (R = -Me, -Et, -Pr y -Bu).

5.2.3. Hidrólisis ácida de los grupos tosilo

A 7.0 mmoles del compuesto N,N'-ditosilado-dialquilado se añadió ácido sulfúrico (0.5 mL por cada 100 mg de compuesto) y se agitó durante 6 horas (Fig. 10) [105]. La solución resultante se ajustó a un pH entre 4 y 6 con hidróxido de amonio y se extrajo en un sistema de acetato de etilo-agua. La fase orgánica se evaporó y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice con una fase móvil de cloroformo-acetato de etilo 90:10.

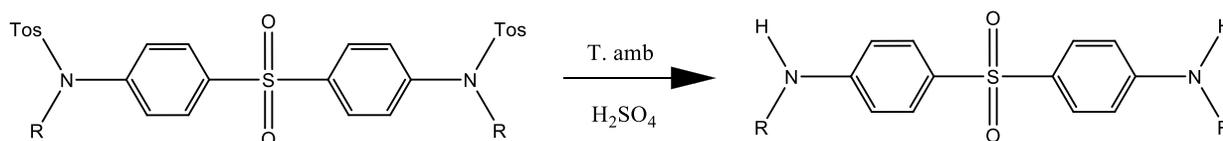


Figura. 10. Hidrólisis ácida de grupos tosilo (R = -Me, -Et, -Pr y -Bu)

El análisis estructural de todos los compuestos finales e intermediarios de reacción sintetizados se realizó mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear de hidrógeno y de carbono (^1H y ^{13}C) utilizando un equipo Varian modelo Mercury 300 operado a una frecuencia de 300 MHz y 75.4 MHz, respectivamente. La asignación de las

señales en los espectros obtenidos se llevó a cabo mediante el análisis de los desplazamientos químicos y de la multiplicidad de las señales.

De manera adicional, la determinación de los puntos de fusión se realizó en un aparato Büchi y los espectros de masas se midieron en un espectrómetro Hewlett Packard modelo 5989-A en modo de impacto electrónico con un voltaje de ionización de 70 eV.

5.3. EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA

5.3.1. Administración del tratamiento

La 4,4'-diaminodifenilsulfona (DDS), los análogos sintetizados y de manera adicional el intermediario N,N'-ditosilado fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) para su administración. Todos los animales (8-12 ratas Wistar macho entre 270 y 300 g por grupo experimental) fueron administrados por vía intraperitoneal 30 minutos antes de la inyección intraestriatal de QUIN con una dosis de 12.5 mg/kg de la molécula original o con dosis equimolares para los cuatro análogos propuestos y para el intermediario ditosilado de acuerdo al grupo experimental, utilizando dos grupos control (testigo y un control de daño positivo con QUIN intraestriatal sin tratamiento farmacológico) administrados únicamente con DMSO.

5.3.2. Inyección intraestriatal de ácido quinolínico

El QUIN fue disuelto en solución salina fisiológica y se ajustó a un pH de 7.4 para preparar una solución con concentración 240 nM y se administró intraestriatalmente en las ratas previamente anestesiadas con pentobarbital sódico (35 mg/kg intraperitoneal). La inyección intraestriatal del QUIN (1 μ L), se realizó utilizando un aparato estereotáxico para roedores pequeños. Dicha inyección se realizó mediante la infusión del QUIN durante 2 minutos de forma unilateral en el hemisferio derecho del cerebro de la rata, con las coordenadas 0.5 mm anterior al bregma, 3.0 mm lateral al bregma y 4.5 ventral a la dura de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson. Al grupo testigo se le administró únicamente solución salina fisiológica con pH 7.4 [80].

5.3.4. Prueba de conducta de giro

La conducta de giro se evaluó en grupos de 8-12 ratas Wistar macho adultas de acuerdo a lo reportado por Santamaría et al., [79]. Seis días después de provocar la lesión con QUIN, se administró a las ratas con clorhidrato de apomorfina (1 mg/kg, subcutánea) disuelto en solución salina fisiológica y se colocaron en cajas de acrílico individual. El número de vueltas ipsilaterales completas con respecto al estriado lesionado se registró visualmente durante 1 hora.

5.3.5. Determinación de GABA intraestriatal

El contenido estriatal de GABA se determinó por cromatografía de líquidos de alta resolución utilizando el método modificado de Pérez-Neri et al., [106]. El cuerpo estriado disecado 7 días después de inducir la lesión con el QUIN y conservado a -70 °C, fue homogenizado en 20 volúmenes de una solución de metanol grado HPLC al 85%, utilizando un procesador ultrasónico (130 W, 40% amplitud, 15 s, 2 ciclos). Posteriormente los homogenados se centrifugaron a 18,500 g por 15 minutos a 4°C y los sobrenadantes obtenidos se analizaron utilizando detector de fluorescencia (serie 1100, Agilent), realizando una derivatización pre-columna con o-ftalaldehido-mercaptoetanol. Los cromatogramas se integraron y procesaron utilizando el programa ChemStation de Agilent, Rev. 10.02. A todas las ratas se les administró ácido β -mercaptopropiónico (1.2 mmol/kg) 3 minutos antes de la disección del cuerpo estriado con la finalidad de detener la producción *post-mortem* de GABA.

5.3.6. Cocientes de concentración líquido cefalorraquídeo-plasma

Para medir el cociente de concentración LCR-plasma de los análogos propuestos así como de la dapsona formada por su metabolismo, se anestesiaron 5-6 ratas Wistar macho adultas (W=300-350 g) con pentobarbital sódico a una dosis de 35 mg/kg. La dapsona y los análogos en evaluación se administraron por vía intraperitoneal a las dosis utilizadas para los experimentos de conducta de giro y determinación de GABA intraestriatal. Media hora

después se extrajeron aproximadamente 150 microlitros de líquido cefalorraquídeo de la cisterna magna, realizando una punción con una aguja calibre 23G unida a una cánula de polietileno P50 y se obtuvieron además mediante punción cardiaca 2 mL de sangre, los cuales se centrifugaron 3 minutos a 3,000 rpm para obtener el plasma[107]. Las muestras de plasma y LCR fueron conservadas a -70°C hasta su análisis.

Para el análisis de las muestras de plasma y LCR, se desarrolló un método de cromatografía de líquidos de alta resolución con un gradiente de 23% de acetonitrilo: 77% ácido acético (1.5% v/v ajustado a un pH de 4.5) a 77% de acetonitrilo: 23% ácido acético (1.5% v/v ajustado a un pH de 4.5) en 17 minutos a una velocidad de flujo de 1 mL/min con un volumen de inyección de muestra de 50 μL . Las muestras de LCR fueron inyectadas directamente para su análisis, mientras que las de plasma (500 μL) fueron desproteinizadas con la adición de ácido perclórico al 70% (50 μL) y neutralizadas con una solución saturada de carbonato de potasio (50 μL) aproximando a la composición de la fase móvil con 400 μL de fase móvil con un 77% de acetonitrilo y centrifugando a 15,000 rpm por 15 min.

Para la determinación de la DDS y de los análogos, se prepararon curvas de calibración de 7 puntos (0.1-8 $\mu\text{g/mL}$) en fase móvil y plasma, obteniéndose coeficientes de regresión para todas las moléculas de al menos 0.99 y coeficientes de variación de lecturas por triplicado de los puntos más bajos de las curvas inferiores al 11% para todas las moléculas.

5.4. EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA

5.4.1. Perfiles de porcentaje de metahemoglobina contra tiempo

Con la finalidad de determinar la hematotoxicidad producida por los metabolitos con capacidad oxidativa (N-hidroxilados) de la DDS y de los análogos propuestos, se obtuvieron los perfiles del porcentaje de metahemoglobina contra tiempo de 6-8 ratas Wistar macho adultas, con peso de 200-250 g, con tiempos de muestreo a las 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 horas, utilizando una dosis de 25 mg/kg para la molécula original y dosis equimolares para los análogos en estudio.

El porcentaje de metahemoglobina fue determinado en las muestras de sangre, mediante una modificación del método espectrofotométrico de Evelyn y Malloy [108].

5.4.2. Determinación de metahemoglobina.

El ensayo utilizado para la determinación del porcentaje relativo de metahemoglobina es una modificación del método original de Evelyn y Malloy (1938). El espectrofotómetro UV (Perkin Elmer, modelo Lambda 25) fue ajustado a una longitud de onda de 635 nm para realizar las lecturas de las muestras procesadas.

Las muestras fueron procesadas de la siguiente manera:

Se tomaron 200 μ L de sangre completa heparinizada y se hemolisaron con 30 segundos de agitación en 10 mL de una solución buffer de fosfatos 0.02M (pH = 7.8) con 0.02% de saponina.

El hemolisado fue alicuotado en 4 tubos, numerados del 1 al 4. El tubo # 1 (A1) permanece como el hemolisado de la sangre total. A los tubos #2 (A2) y #4 (A4) se les añadió una alícuota de 50 μ L de una solución de ferrocianuro de potasio al 20%.

Finalmente una alícuota de 50 μ L de una solución de cianuro de potasio al 10% se añadió a los tubos #3 (A3) y #4 (A4). Los niveles relativos de metahemoglobina fueron calculados mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Metahemoglobina} = \left(\frac{A1 - A2}{A3 - A4} \right) \times 100$$

5.5. TRATAMIENTO DE DATOS

Para el análisis de datos, se utilizaron las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney debido a que la homogeneidad de varianza entre los grupos experimentales resultó significativamente diferente ($p < 0.05$). Dichas pruebas estadísticas se realizaron mediante el paquete de software S.S.P.S v14.0.

6. RESULTADOS

6.1. Síntesis orgánica

La síntesis de los análogos se realizó en tres etapas. A continuación se encuentran los datos de caracterización físicoquímica y estructural de cada uno de los compuestos obtenidos.

6.1.1. Producto de la N,N'-ditosilación de los grupos amino de la 4,4'-diaminodifenilsulfona

Datos de caracterización

N,N'-ditosil-4,4'-diaminodifenilsulfona (Fig 11.)

Rendimiento 71%; polvo fino blanco, ligeramente soluble en acetato de etilo, moderadamente soluble en cloroformo y acetona; punto de fusión (p. f.) 261-262 °C; RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ ppm 7.72 (2A₂, 8H, $J = 8.8$), 7.40 (sa, 2H, -NH-), 7.25 (X₂, 4H, $J = 8.0$), 7.14 (X₂, 4H, $J = 9.1$), 2.41 (s, 6H, -CH₃), ver figs. 12 y 13; RMN de ^{13}C (75.4 MHz, CDCl_3) δ ppm 144.0, 142.6, 136.2, 135.3, 129.0, 128.9, 126.7, 118.4, 20.9 (Fig. 14); EMIE m/z : 556.15 calculada para $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_3$.

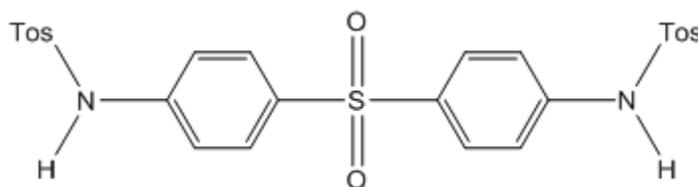


Figura 11. N,N'-ditosil-4,4'-diaminodifenilsulfona (Tos-DDS)

DDS-3

Pulse Sequence: s2pul

Solvent: cdc13

Ambient temperature

Sample #3

Mercury-300BB "auxiliar"

Date :Nov 7 2007

Relax. delay 1.358 sec

Pulse 68.5 degrees

Acq. time 3.642 sec

Width 4496.4 Hz

4 repetitions

OBSERVE H1, 300.0441676 MHz

DATA PROCESSING

FT size 32768

Total time 0 min, 36 sec

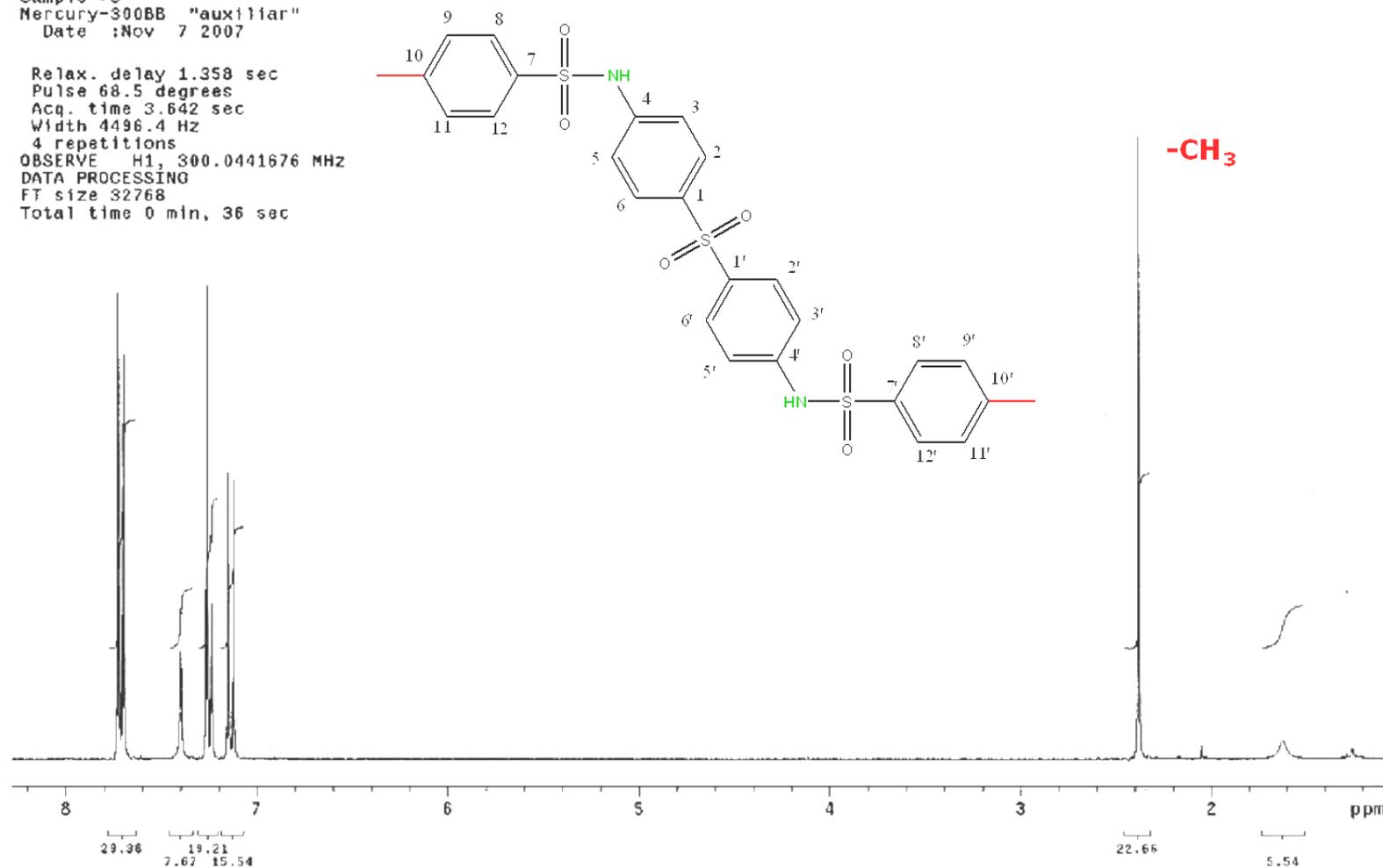


Figura 12. Espectro de RMN de ¹H de la N,N'-ditosil-4,4'-diaminodifenilsulfona (Tos-DDS), obtenido en un equipo Varian mod. Mercury 300 operado a una frecuencia de 300 MHz en cloroformo deuterado (CDCl₃). Se indica la asignación tentativa en base a los efectos electrónicos de la señal simple correspondiente a la de los protones de los grupos metilo pertenecientes a los sustituyentes tosilos de la molécula.

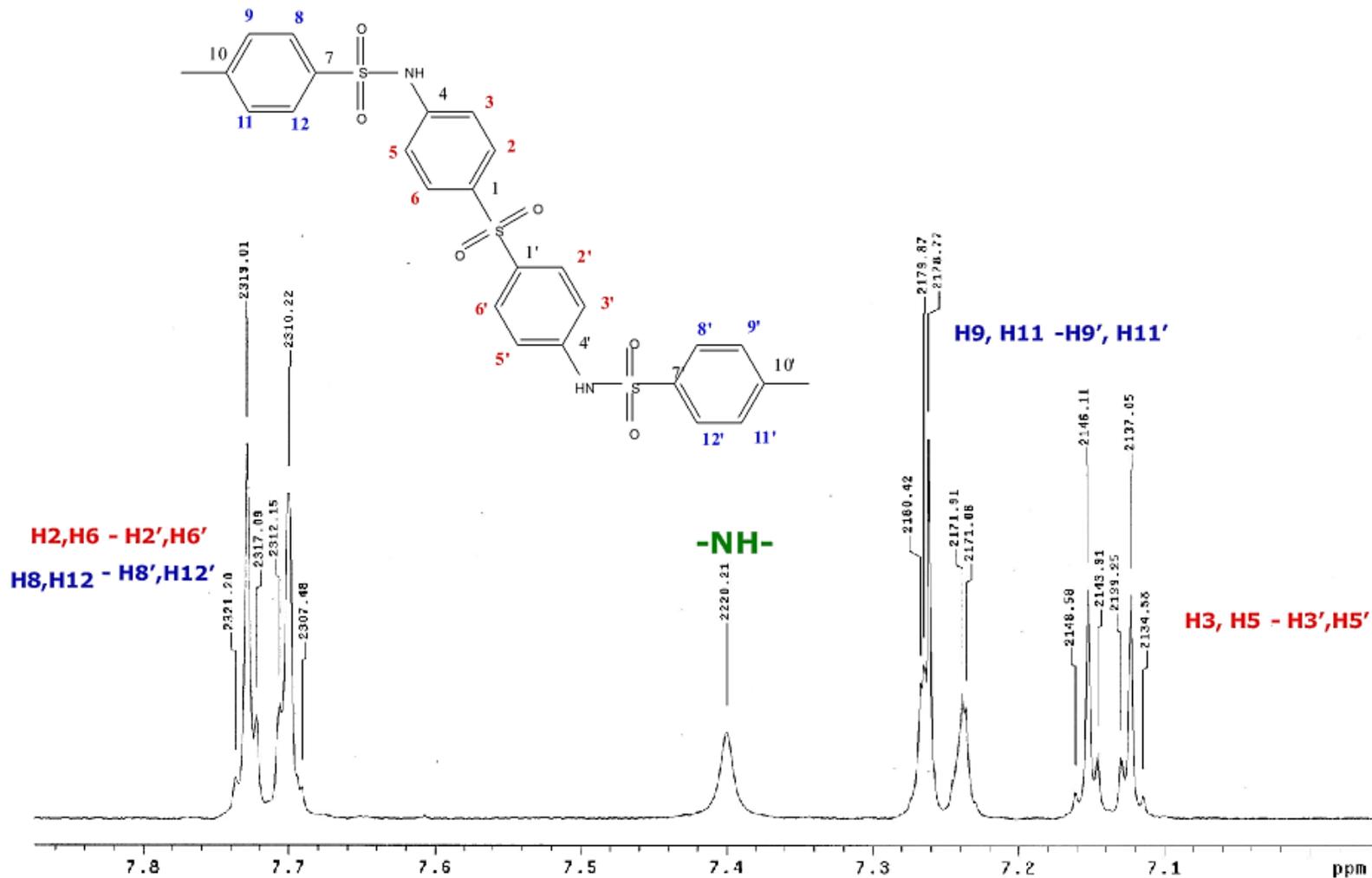


Figura 13. Ampliación de la región que comprende entre las 7 -8 ppm del espectro de RMN de ¹H de la N,N'-ditosil-4,4'-diaminodifenilsulfona (Tos-DDS), obtenido en un equipo Varian mod. Mercury 300 operado a una frecuencia de 300 MHz en CDCl₃. Se encuentran indicadas las asignaciones tentativas en base a los efectos electrónicos de los protones correspondientes a los 2 sistemas A₂X₂ de los anillos aromáticos de la molécula, así como la señal sencilla ancha correspondiente a los grupos amino.

13C OBSERVE

Pulse Sequence: s2pu1

Solvent: dms0
Ambient temperature
Sample #4
Mercury-300BB "auxiliar"
Date :Jan 30 2008

Relax. delay 2.000 sec
Pulse 55.7 degrees
Acq. time 1.764 sec
Width 18867.9 Hz
2720 repetitions
OBSERVE C13, 75.4465557 MHZ
DECOUPLE H1, 300.0470478 MHZ
Power 33 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 131072
Total time 56 hr, 17 min, 51 sec

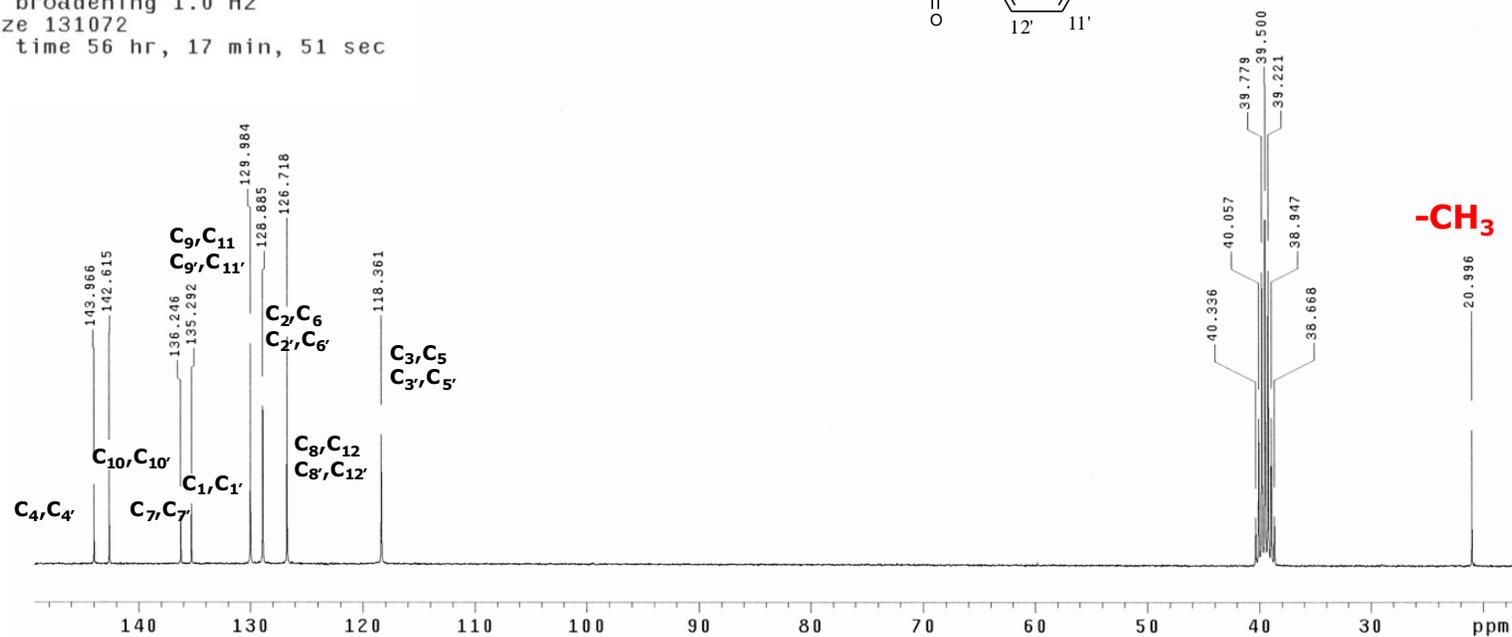
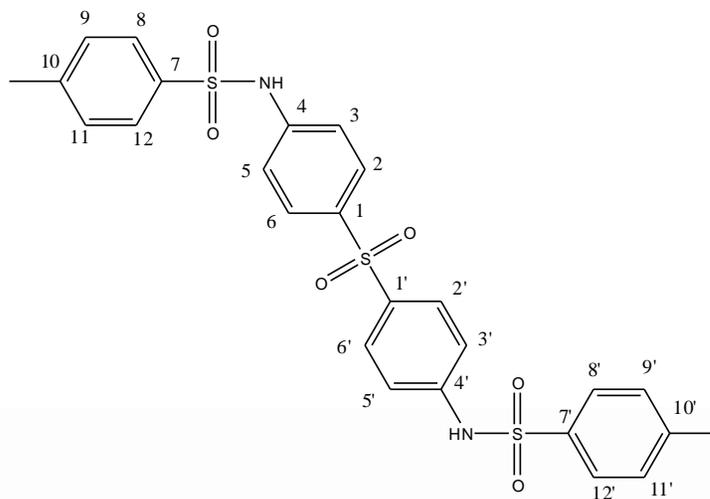


Figura 14. Espectro de RMN de ¹³C de la N,N'-ditosil-4,4'-diaminodifenilsulfona (Tos-DDS), obtenido en un equipo Varian mod. Mercury 300 operado a una frecuencia de 75.4 MHz en CDCl₃. Se indican las asignaciones tentativas en base a los efectos electrónicos de las señales correspondientes a los carbonos de la molécula. La señal en 20.996 ppm, corresponde a los carbonos de los grupos metilo de los grupos tosilo presentes en la molécula.

6.1.2. Productos de la N,N'-dialquilación de los grupos amino del intermediario N,N'-ditosilado de la dapsona

Un resumen de la estructura de las moléculas obtenidas durante la segunda etapa de la síntesis, se encuentra en la tabla 1.

TABLA 1. Estructura de los intermediarios N,N'-dialquilados de la N,N'-ditosil-4,4'-diaminodifenilsulfona

Molécula	R
N,N'-dimetil-N,N'-ditosil-4,4'-diaminodifenilsulfona	-H
N,N'-dietil-N,N'-ditosil-4,4'-diaminodifenilsulfona	-CH ₃
N,N'-dipropil-N,N'-ditosil-4,4'-diaminodifenilsulfona	-CH ₂ -CH ₃
N,N'-dibutil-N,N'-ditosil-4,4'-diaminodifenilsulfona	-(CH ₂) ₂ -CH ₃

Datos de caracterización

N,N'-Dimetil-N,N'-ditosil-4,4'-diaminodifenilsulfona

Rendimiento 57%; polvo blanco cristalino fino, soluble en acetato de etilo, cloroformo y diclorometano; p. f. 222-223°C; RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.86 (A₂, 4H, J = 8.9), 7.40 (A₂, 4H, J = 8.2), 7.30 (X₂, 4H, J = 8.9), 7.25 (B₂, 4H, J = 7.9), 3.17 (s, 6H, -N-CH₃), 2.41 (s, 6H, -CH₃), ver Figs 15 y 16; RMN de ¹³C (75.4 MHz, CDCl₃) δ ppm 146.2, 144.3, 138.9, 132.9, 129.7, 128.4, 127.6, 126.1, 37.4, 21.5 (Fig. 17); EMIE m/z: 584.25 calculada para C₂₈H₂₈N₂O₆S₃.

N,N'-Dietil-N,N'-ditosil-4,4'-diaminodifenilsulfona

Rendimiento 59%; polvo blanco cristalino fino, soluble en acetato de etilo, cloroformo y diclorometano; p. f. 191-192°C; RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ ppm 7.90 (d, 4H, $J = 8.8$), 7.45 (d, 4H, $J = 8.2$), 7.24-7.29 (m, 8H), 3.61 (cuádruple, 4H, $-\text{CH}_2-$), 2.42 (s, 6H, $-\text{CH}_3$), 1.08 (t, 6H, $-\text{N}-\text{CH}_3$), ver Figs. 18 y 19; RMN de ^{13}C (75.4 MHz, CDCl_3) δ ppm; 144.0, 143.9, 139.7, 129.7, 128.6, 127.4, 45.1, 21.5, 13.9 (Fig. 20); EMIE m/z : 612.30 calculada para $\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_3$.

N,N'-Dipropil-N,N'-ditosil-4,4'-diaminodifenilsulfona

Rendimiento 65%; polvo blanco cristalino fino, soluble en acetato de etilo, cloroformo y diclorometano; p. f. 149-150°C; RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ ppm 7.89 (d, 4H, $J = 8.8$), 7.43 (d, 4H, $J = 8.3$), 7.22-7.28 (m, 8H), 3.50 (t, 4H, $-\text{CH}_2-$), 2.42 (s, 6H, $-\text{CH}_3$), 1.43 (sext, 4H, $-\text{CH}_2-$), 0.87 (t, 6H, $-\text{N}-\text{CH}_3$), ver Figs. 21 y 22; RMN de ^{13}C (75.4 MHz, CDCl_3) δ ppm; 144.3, 143.9, 139.7, 134.8, 129.7, 128.8, 128.6, 127.5, 51.7, 21.5, 21.4, 10.9 (Fig. 23); EMIE m/z : 640.30 calculada para $\text{C}_{32}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_3$.

N,N'-Dibutil-N,N'-ditosil-4,4'-diaminodifenilsulfona

Rendimiento 52%; polvo fino blanco, soluble en acetato de etilo, cloroformo y diclorometano; p. f. 185-186°C; RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ ppm 7.89 (d, 4H, $J = 8.5$), 7.43 (d, 4H, $J = 8.2$), 7.24-7.28 (m, 8H), 3.53 (t, 4H, $-\text{CH}_2-$), 2.42 (s, 6H, $-\text{CH}_3$), 1.25-1.411 (m, 8H, $-\text{CH}_2-$), 0.85 (t, 6H, $-\text{N}-\text{CH}_3$), ver Figs. 24 y 25; RMN de ^{13}C (75.4 MHz, CDCl_3) δ ppm; 144.3, 143.9, 139.7, 134.7, 129.7, 128.8, 128.6, 127.5, 49.7, 30.1, 21.54, 19.54, 13.48 (Fig. 26); EMIE m/z : 668.25 calculada para $\text{C}_{34}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_3$.

DDS-4
STANDARD 1H OBSERVE

Sample directory: auto_23Nov2007

Pulse Sequence: s2pu1
Solvent: cdc13
Ambient temperature
Date : Nov 23 2007
Sample #5
File: 0201
Mercury-300 "ce1"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 3.636 sec
Width 4800.8 Hz
256 repetitions
OBSERVE H1, 300.0751828 MHz
DATA PROCESSING
FT size 65536
Total time 21 min, 22 sec

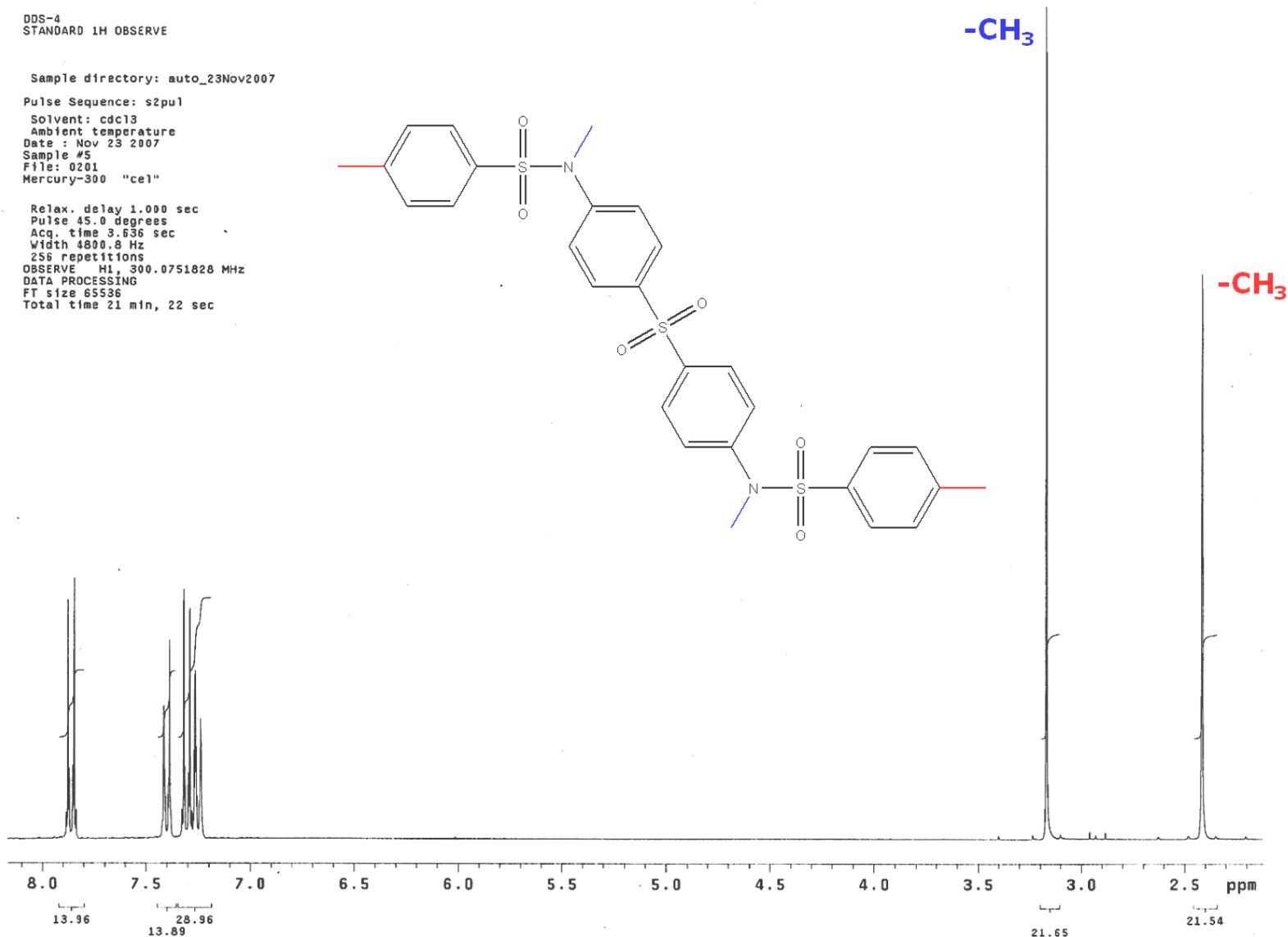


Figura 15. Espectro de RMN de ¹H de la *N,N'*-dimetil-*N,N'*-ditosil-4,4'-diaminodifenilsulfona, obtenido en un equipo Varian mod. Mercury 300 a una frecuencia de 300 MHz en CDCl₃. Se indica en color la asignación tentativa en base a los efectos electrónicos de las señales simples correspondientes a la de los protones de los grupos metilo presentes en la molécula.

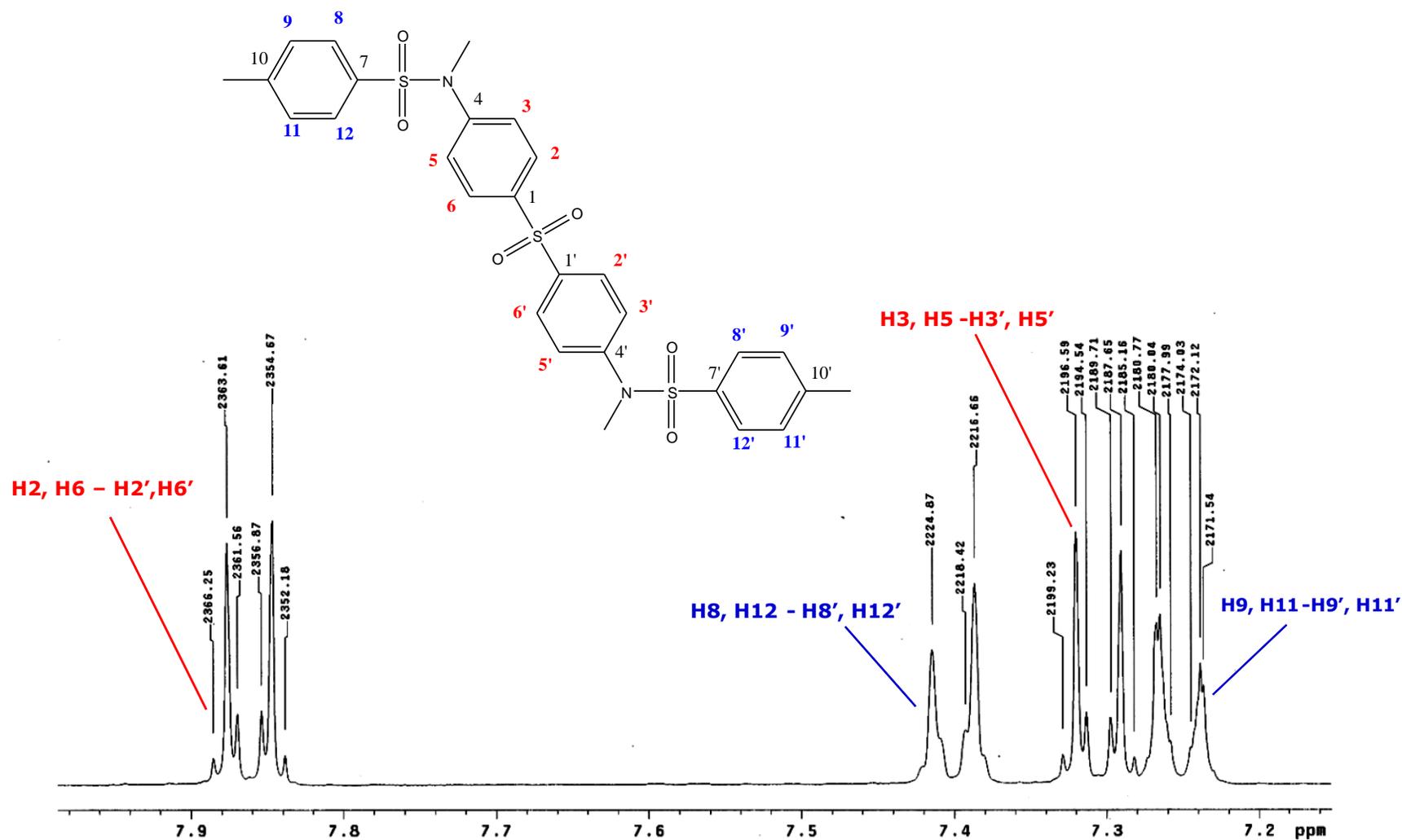


Figura 16. Ampliación de la región que comprende entre las 7 -8 ppm del espectro de RMN de ¹H de la *N,N'*-dimetil-*N,N'*-ditosil-4,4'-diaminodifenilsulfona, obtenido en un equipo Varian mod. Mercury 300 a una frecuencia de 300 MHz en CDCl₃. Se encuentran indicadas las asignaciones tentativas en base a los efectos electrónicos de los protones correspondientes a los sistemas A₂B₂ y A₂X₂ correspondientes a los anillos aromáticos de la molécula.

DDS-4
STANDARD 1H OBSERVE

Archive directory: /export/home/vnmr1/vnmrsys/
Sample directory: auto_23Nov2007

Pulse Sequence: s2pu1

Solvent: cdcl3
Ambient temperature
Date : Nov 23 2007
Sample #5
File: 0202
Mercury-300 "cel"

Relax. delay 2.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.764 sec
Width 16977.9 Hz
25000 repetitions
OBSERVE C13, 75.4539687 MHz
DECOUPLE H1, 300.0766856 MHz
Power 38 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 65536
Total time 26 hr, 45 min, 32 sec

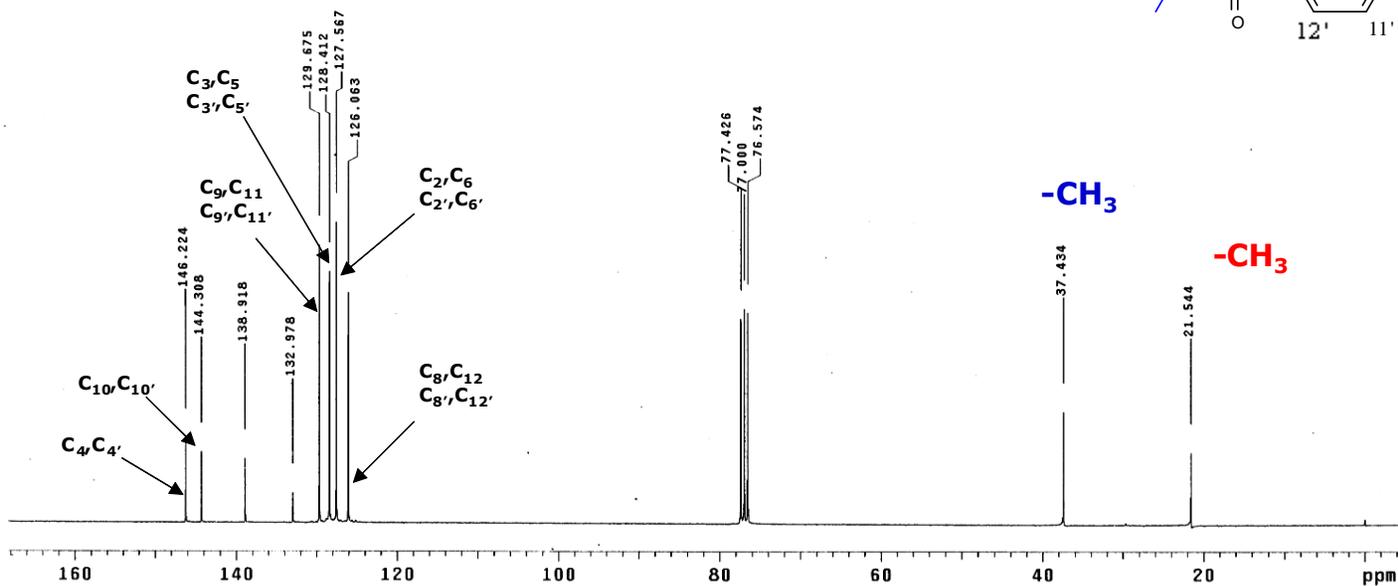
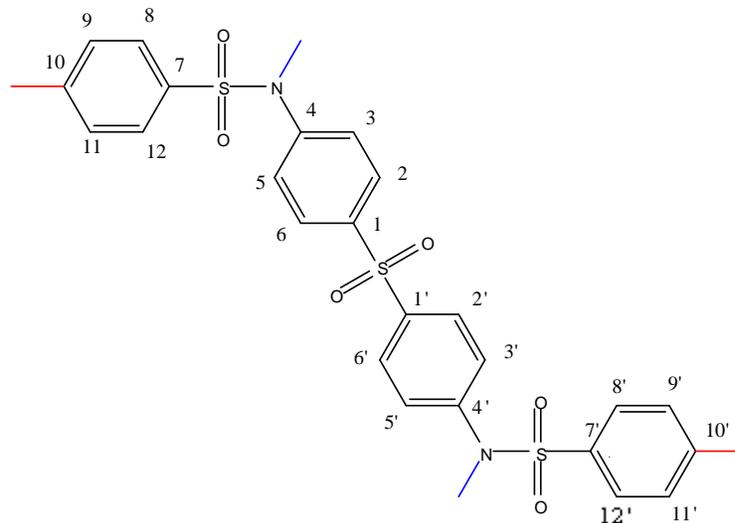


Figura 17. Espectro de RMN de ^{13}C de la N,N'-dimetil-N,N'-ditosil-4,4'-diaminodifenilsulfona, obtenido en un equipo mod. Mercury 300 a una frecuencia de 75.4 MHz en CDCl_3 . En el espectro se indican las asignaciones tentativas en base a los efectos electrónicos de las señales correspondientes a los carbonos de la molécula.

DDS-6
STANDARD 1H OBSERVE

Archive directory: /export/home/vnmr1/vnmrSYS/data
Sample directory: auto_07Dec2007

Pulse Sequence: s2pu1
Solvent: cdc13
Ambient temperature
Sample #2
File: 0401
Mercury-300BB "auxiliar"
Date :Dec 7 2007

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 3.642 sec
Width 4793.9 Hz
32 repetitions
OBSERVE H1, 300.0441659 MHz
DATA PROCESSING
FT size 65536
Total time 3 min, 1 sec

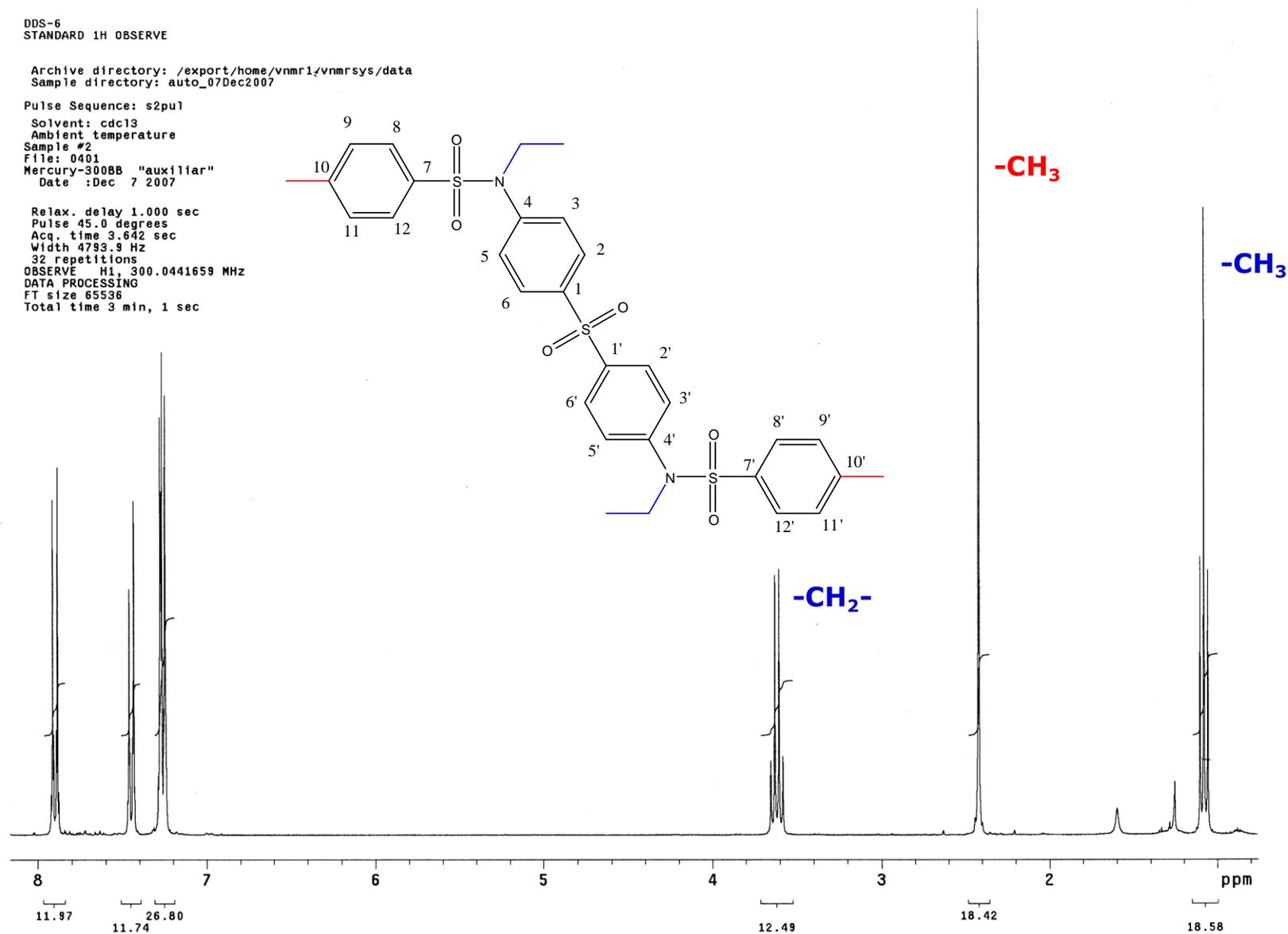


Figura 18. Espectro de RMN de ¹H de la *N,N'*-diethyl-*N,N'*-ditosil-4,4'-diaminodifenilsulfona, obtenido en un equipo Varian mod. Mercury 300 a una frecuencia de 300 MHz en CDCl₃. Se indica en color la asignación tentativa en base a los efectos electrónicos de las señales correspondientes a la de los protones de los grupos alquílicos presentes en la molécula.

DDS-6
STANDARD 1H OBSERVE

Archive directory: /export/home/vnmr1/vnmrsys/dat
Sample directory: auto_07Dec2007

Pulse Sequence: s2pu1
Solvent: cdcl3
Ambient temperature
Sample #2
File: 0402
Mercury-300BB "auxiliar"
Date :Dec 7 2007

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.767 sec
Width 15822.8 Hz
5000 repetitions
OBSERVE C13, 75.4461676 MHz
DECOUPLE H1, 300.0456226 MHz
Power 33 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 65536
Total time 3 hr, 57 min, 46 sec

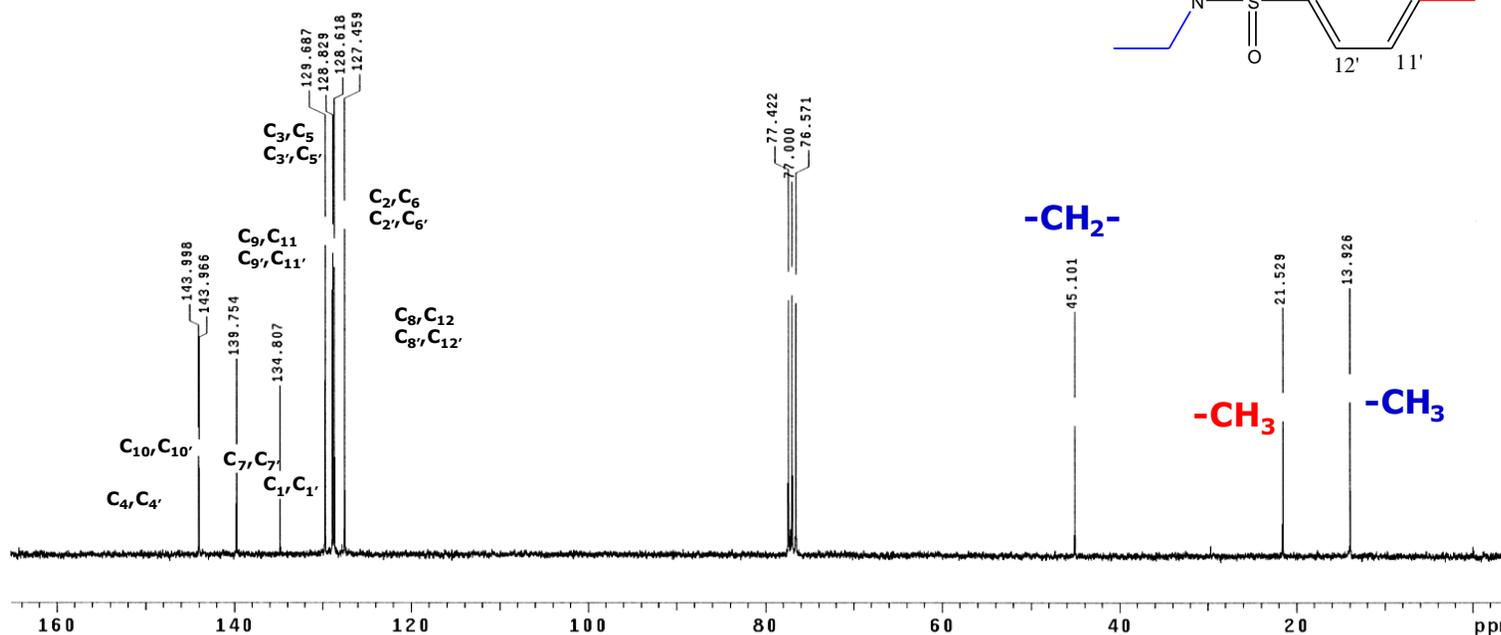
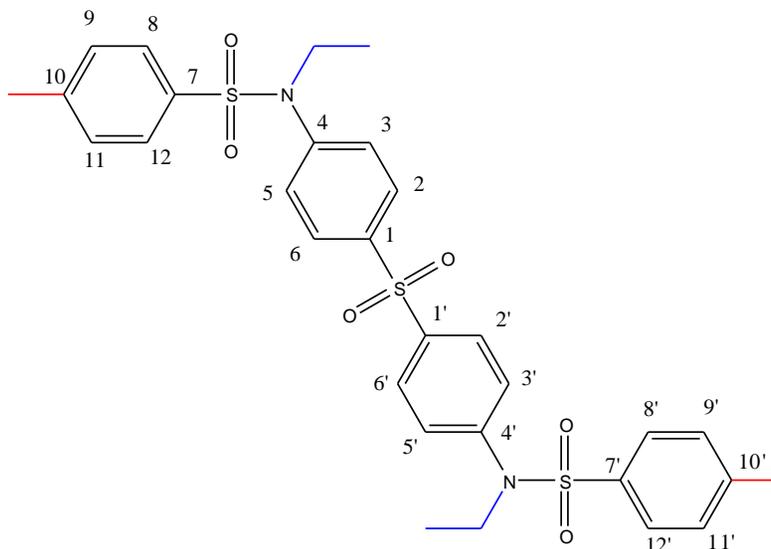


Figura 20. Espectro de RMN de ^{13}C de la N,N'-diethyl-N,N'-ditolyl-4,4'-diaminodifenilsulfona, obtenido en un equipo Varian mod. Mercury 300 a una frecuencia de 75.4 MHz en CDCl_3 . En el espectro se indican las asignaciones tentativas en base a los efectos electrónicos de las señales correspondientes a los carbonos de la molécula.

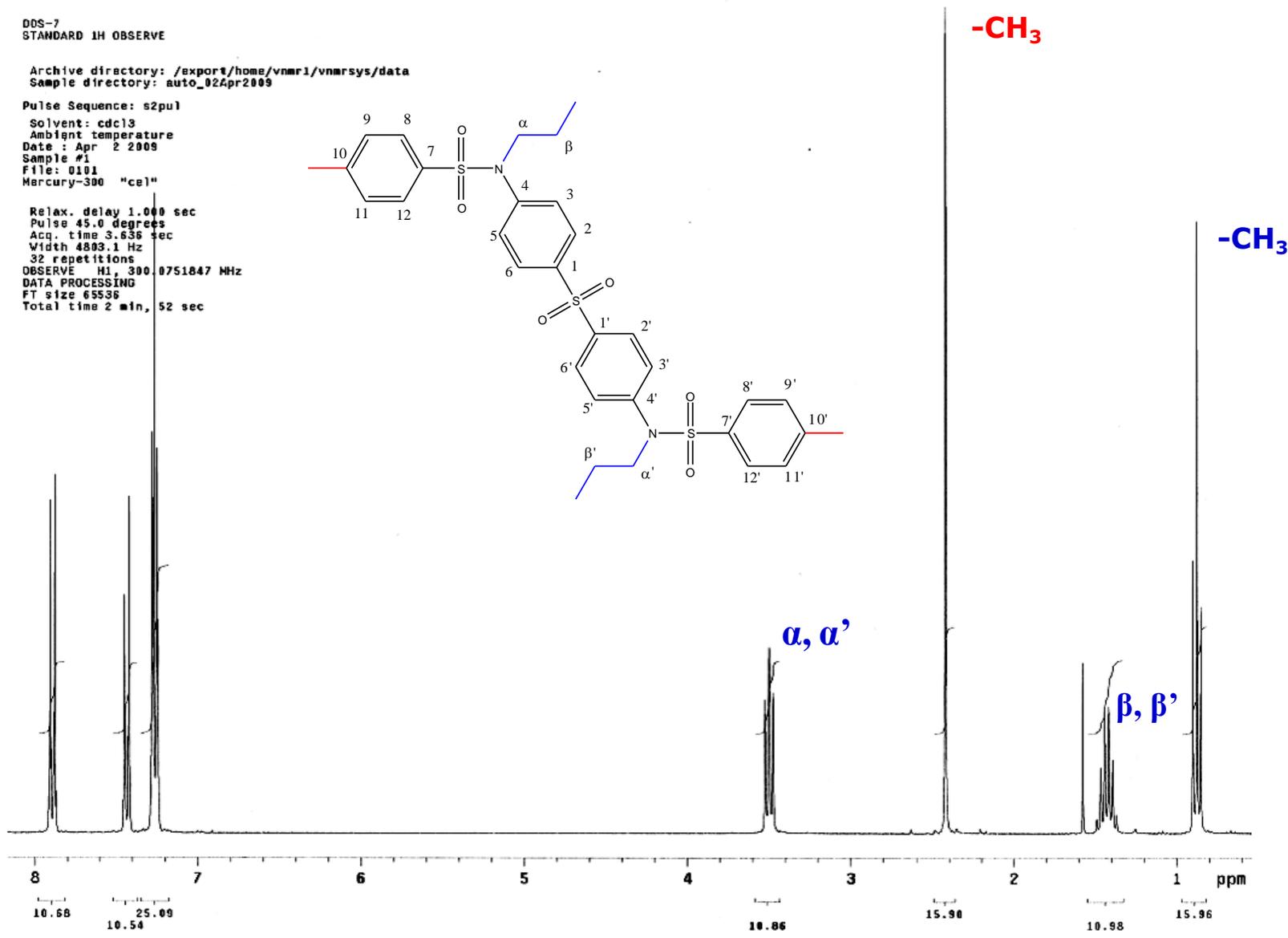


Figura 21. Espectro de RMN de ¹H de la N,N'-dipropil-N,N'-ditosil-4,4'-diaminodifenilsulfona, obtenido en un equipo Varian mod. Mercury 300 operado a una de 300 MHz en CDCl₃. Se indica en color la asignación tentativa en base a los efectos electrónicos de las señales correspondientes a la de los protones de los grupos alquílicos presentes en la molécula.

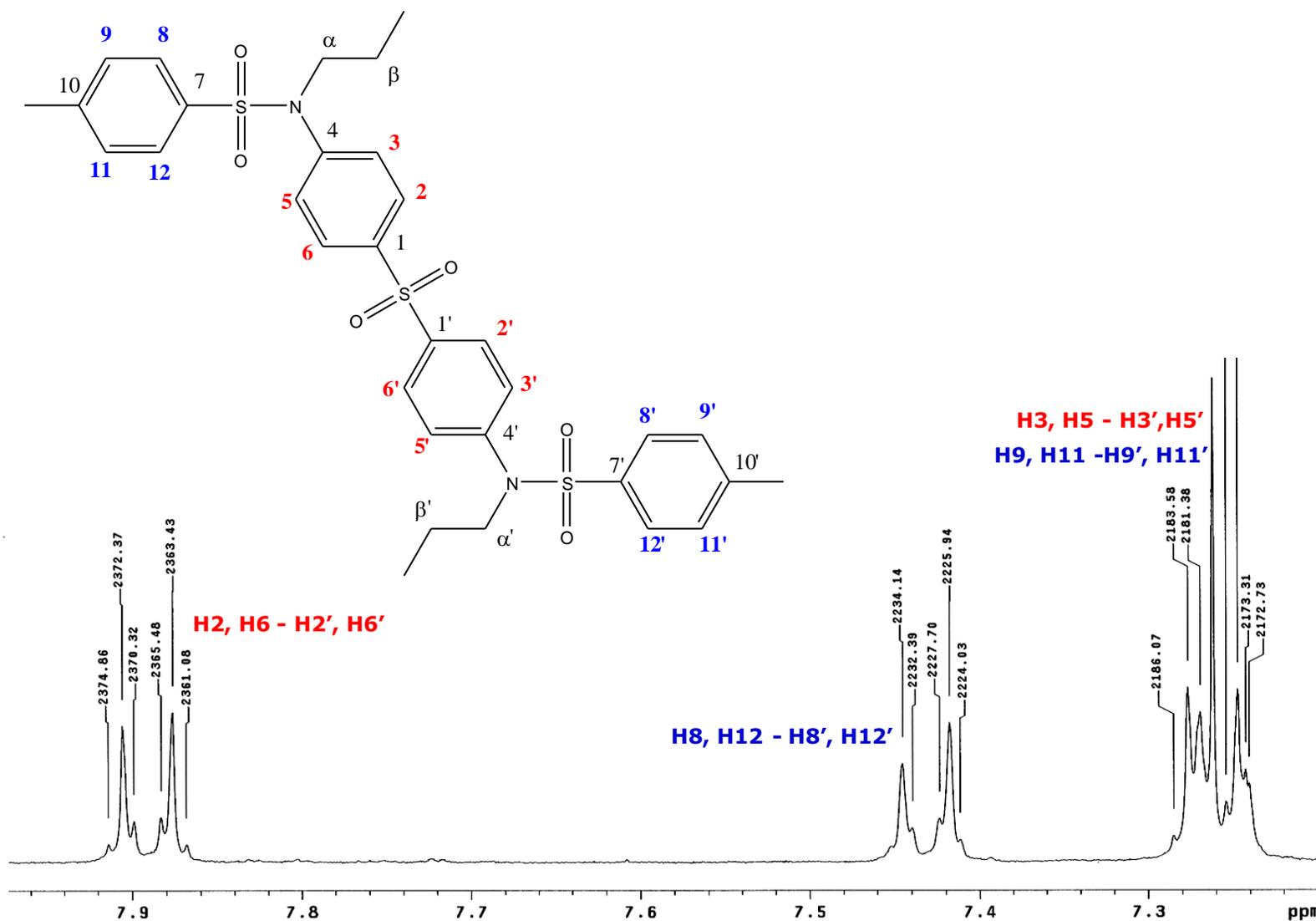


Figura 22. Ampliación de la región que comprende entre las 7 -8 ppm del espectro de RMN de ¹H de la *N,N'*-dipropil-*N,N'*-ditosil-4,4'-diaminodifenilsulfona, obtenido en un equipo Varian mod. Mercury 300 a una frecuencia de 300 MHz en CDCl₃. Se encuentran indicadas las asignaciones tentativas en base a los efectos electrónicos de los protones correspondientes a los sistemas A₂B₂ y A₂X₂ correspondientes a los anillos aromáticos de la molécula.

Archive directory: /export/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory: auto_02Apr2009

Pulse Sequence: s2pul

Solvent: cdcl3
Ambient temperature
Date : Apr 2 2009
Sample #1
File: 0102
Mercury-300 "cel"

Relax. delay 2.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.754 sec
Width 18867.3 Hz
20000 repetitions
OBSERVE C13, 75.4539662 MHz
DECOUPLE H1, 300.0766856 MHz
Power 38 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 131072
Total time 21 hr, 26 min, 29 sec

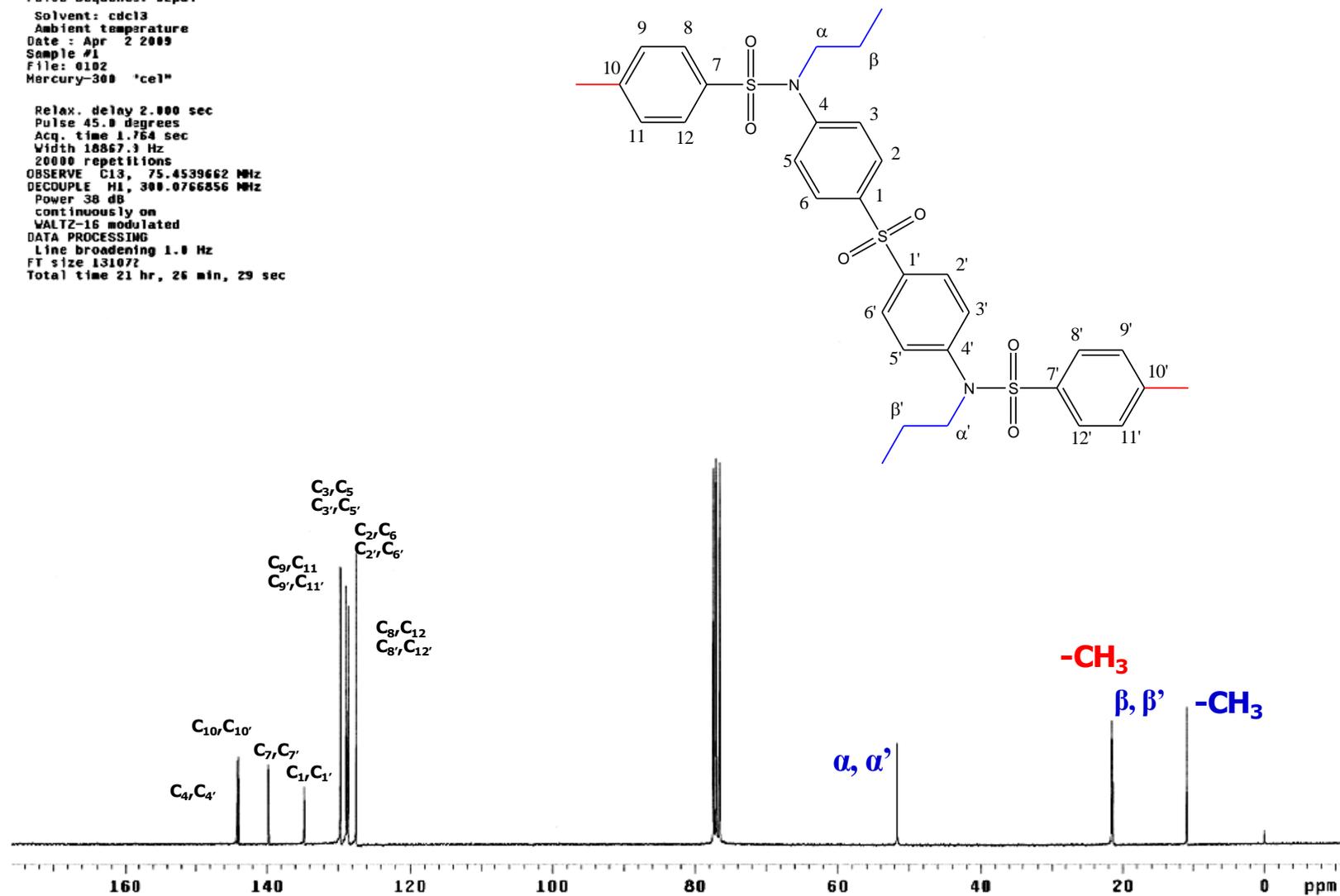


Figura 23. Espectro de RMN de ¹³C de la *N,N'*-dipropil-*N,N'*-ditosil-4,4'-diaminodifenilsulfona, obtenido en un equipo Varian mod. Mercury 300 a una frecuencia de 75.4 MHz en CDCl₃. En el espectro se indican las asignaciones tentativas en base a los efectos electrónicos de las señales correspondientes a los carbonos de la molécula.

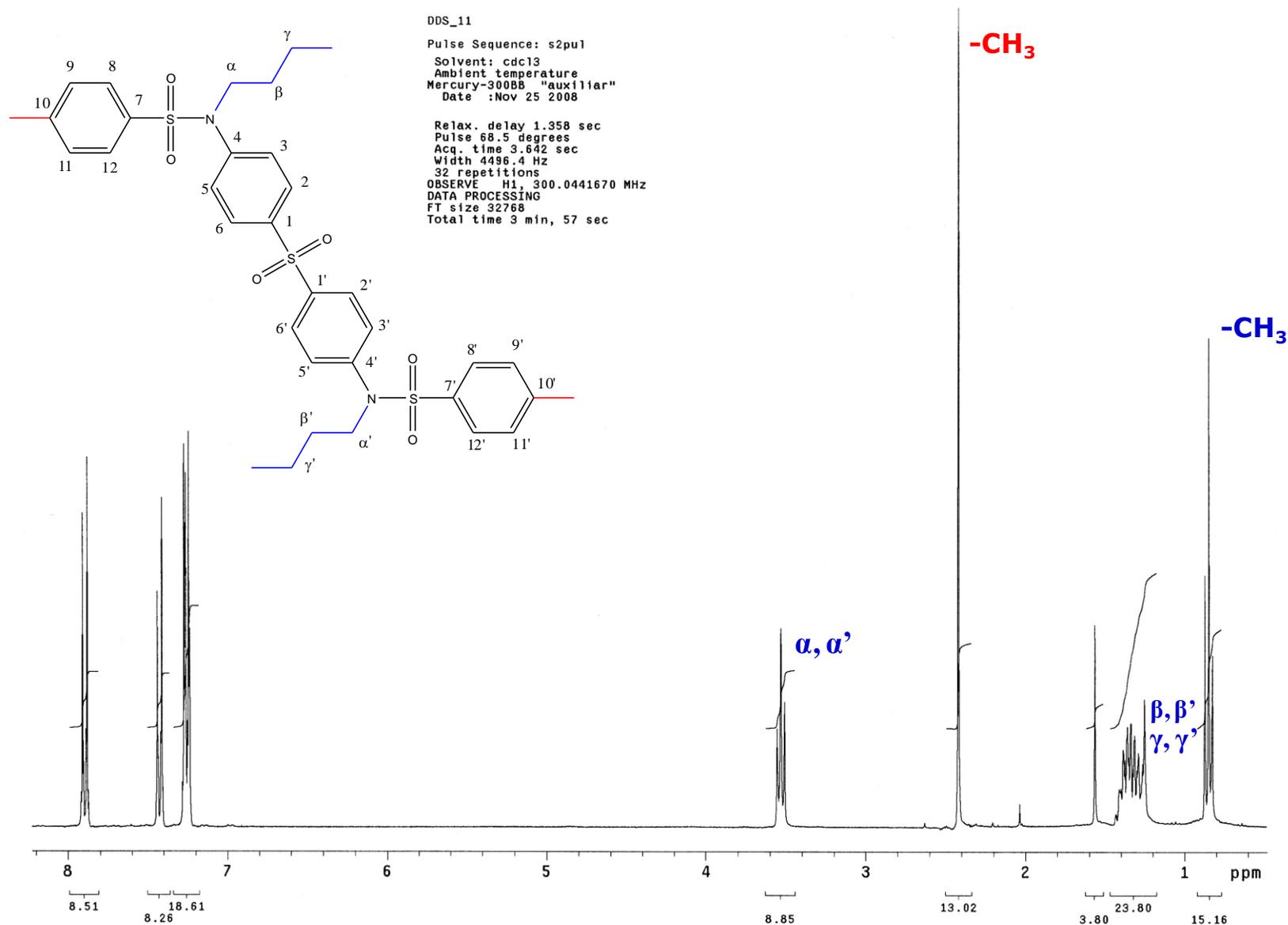


Figura 24. Espectro de RMN de ^1H de la N,N'-dibutil-N,N'-ditosil-4,4'-diaminodifenilsulfona, obtenido en un equipo Varian mod. Mercury 300 a una frecuencia de 300 MHz en CDCl_3 . Se indica en color la asignación tentativa en base a los efectos electrónicos de las señales correspondientes a la de los protones de los grupos alquílicos presentes en la molécula.

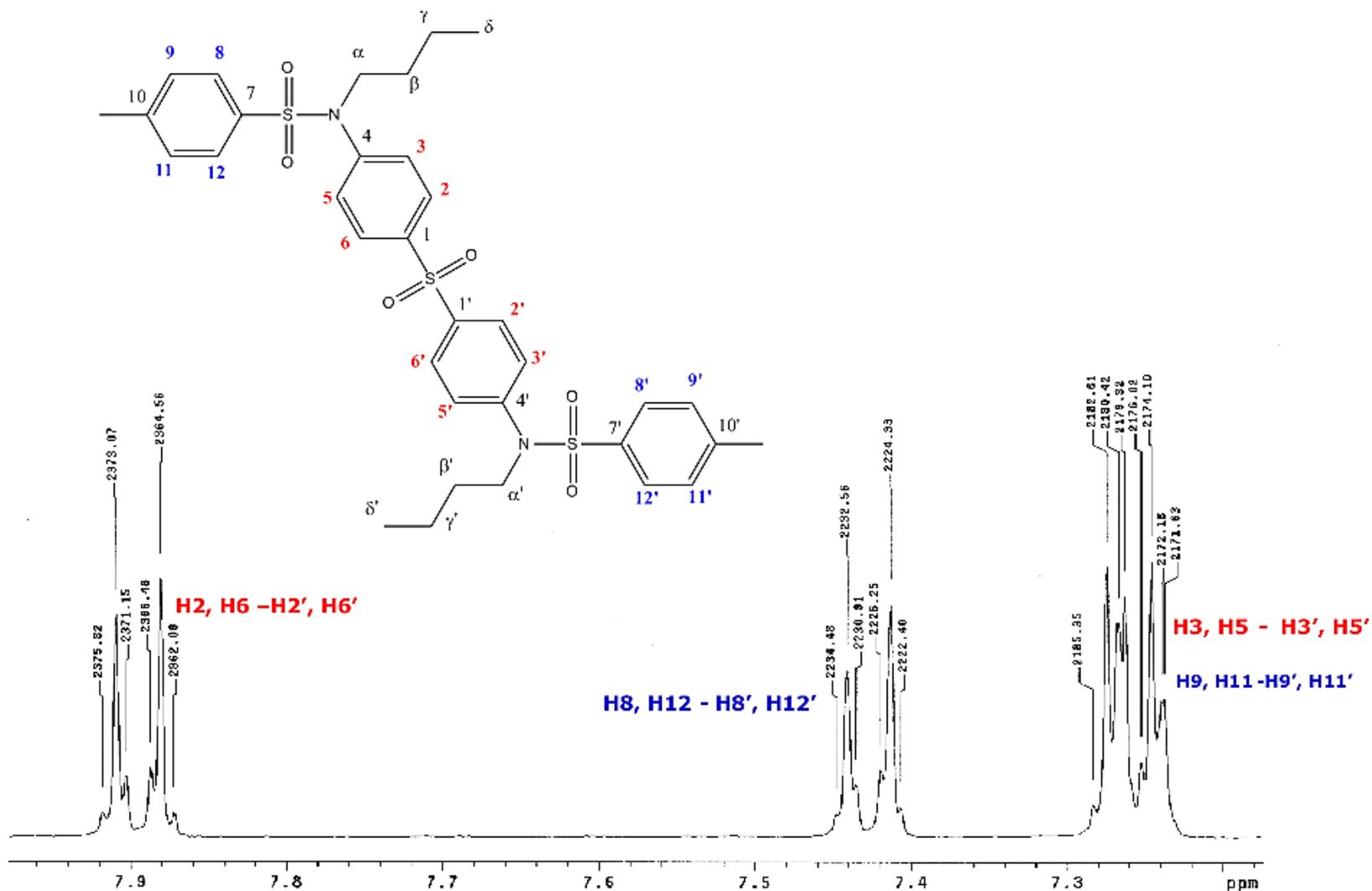


Figura 25. Ampliación de la región que comprende entre las 7 -8 ppm del espectro de RMN de ¹H de la *N,N'*-dibutil-*N,N'*-ditosil-4,4'-diaminodifenilsulfona, obtenido en un equipo Varian mod. Mercury 300 a una frecuencia de 300 MHz en CDCl₃. Se encuentran indicadas las asignaciones tentativas en base a los efectos electrónicos de los protones correspondientes a los sistemas A₂B₂ y A₂X₂ correspondientes a los anillos aromáticos de la molécula.

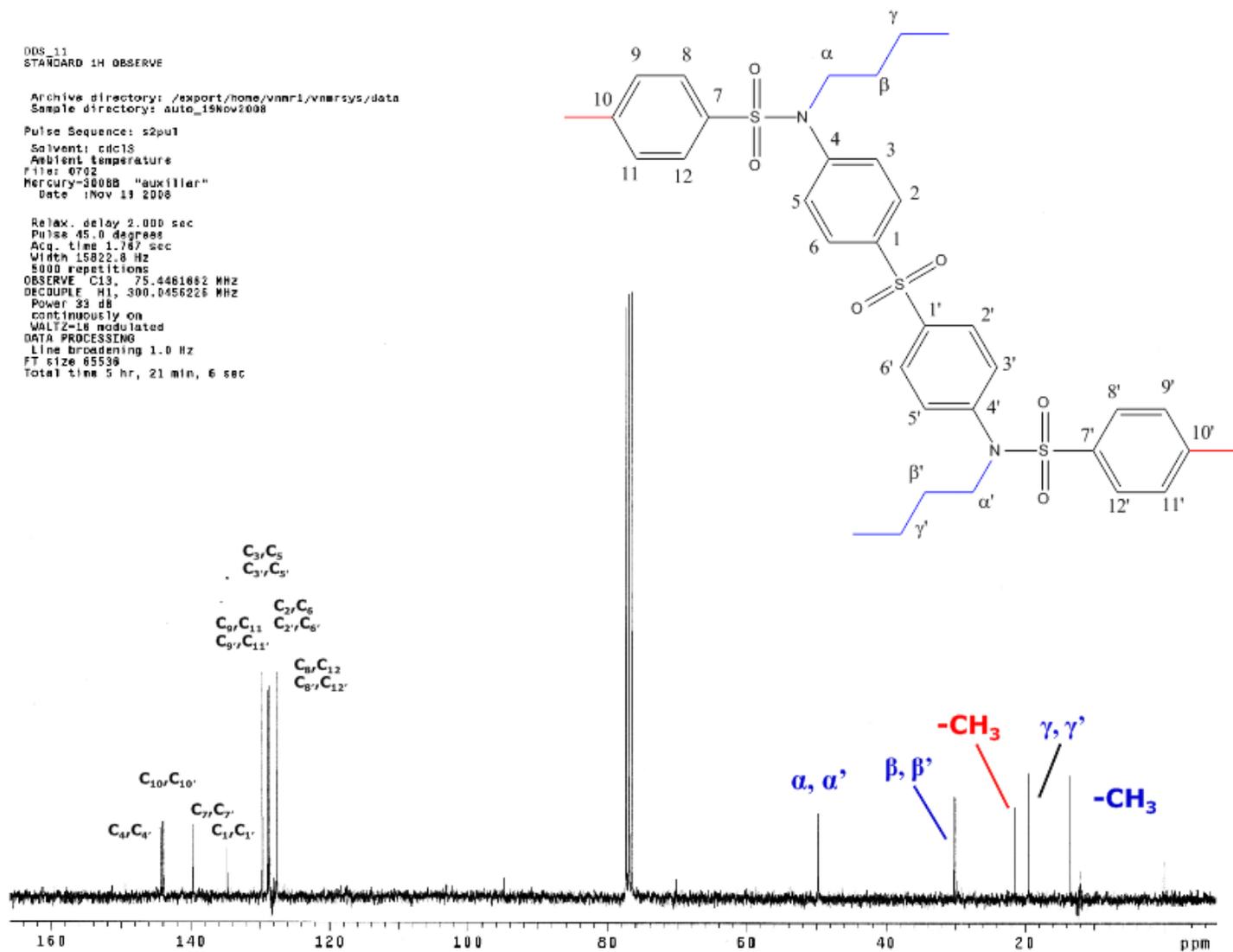
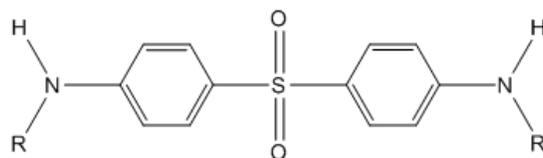


Figura 26. Espectro de RMN de ^{13}C de la N,N'-dibutil-N,N'-ditosil-4,4'-diaminodifenilsulfona, obtenido en un equipo Varian mod. Mercury 300 a una frecuencia de 75.4 MHz en $CDCl_3$. En el espectro se indican las asignaciones tentativas en base a los efectos electrónicos de las señales correspondientes a los carbonos de la molécula.

6.1.3. Productos de la hidrólisis ácida de los grupos tosilo

Un resumen de la estructura de las moléculas obtenidas durante la tercera y última etapa de la síntesis, se encuentra en la tabla 2, así como las abreviaturas utilizadas en la sección de la evaluación biológica.

TABLA 2. Estructura y nomenclatura de los análogos N,N'-dialquilados de la 4,4'-diaminodifenilsulfona obtenidos.



Molécula	R	Abreviatura en texto
N,N'-dimetil-4,4'-diaminodifenilsulfona	-CH ₃	Me-DDS
N,N'-dietil-4,4'-diaminodifenilsulfona	-CH ₂ -CH ₃	Et-DDS
N,N'-dipropil-4,4'-diaminodifenilsulfona	-(CH ₂) ₂ -CH ₃	Pr-DDS
N,N'-dibutil-4,4'-diaminodifenilsulfona	-(CH ₂) ₃ -CH ₃	Bu-DDS

Datos de caracterización de los análogos propuestos:

N,N'-Dimetil-4,4'-diaminodifenilsulfona (Me-DDS)

Rendimiento 98%; polvo color crema cristalino soluble en acetato de etilo, cloroformo y diclorometano; p. f. 187-188°C; RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.68 (A₂, 4H, J = 8.9), 6.53 (X₂, 4H, J = 8.9), 4.22 (sa, 2H, -NH-), 2.84 (s, 6H, -CH₃), ver Figs. 27 y 28; RMN de ¹³C (75.4 MHz, CDCl₃) δ ppm 152.3, 129.8, 129.0, 111.4, 30.1 (Fig. 29); EMIE m/z: 276.15 calculada para C₁₄H₁₆N₂O₂S.

N,N'-Dietil-4,4'-diaminodifenilsulfona (Et-DDS)

Rendimiento 93%; polvo blanco cristalino fino soluble en acetato de etilo, cloroformo y diclorometano; p. f. 182-183°C; RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ ppm 7.66 (A_2 , 4H, $J = 8.9$), 6.52 (X_2 , 4H, $J = 8.9$), 4.06 (sa, 2H, -NH-), 3.15 (quint, 4H, - CH_2 -), 1.24 (t, 6H, - CH_3), ver Figs. 30 y 31; RMN de ^{13}C (75.4 MHz, CDCl_3) δ ppm 151.4, 129.7, 129.1, 111.6, 37.9, 14.5 (Fig. 32); EMIE m/z : 304.41 calculada para $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$.

N,N'-Dipropil-4,4'-diaminodifenilsulfona (Pr-DDS)

Rendimiento 71%; polvo blanco cristalino fino altamente soluble en acetato de etilo, cloroformo y diclorometano; p. f. 170-171°C; RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ ppm 7.49 (A_2 , 4H, $J = 8.9$), 6.58 (X_2 , 4H, $J = 8.9$), 6.54 (t, 2H, -NH-), 2.98 (cuádruple, 4H, - CH_2 -), 1.52 (sext, 4H, - CH_2 -), 0.90 (t, 6H, - CH_3), ver Figs. 33 y 34; RMN de ^{13}C (75.4 MHz, CDCl_3) δ ppm 152.2, 128.4, 127.8, 110.9, 44.1, 21.6, 11.5 (Fig. 35); EMIE m/z : 332.25 calculada para $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$.

N,N'-Dibutil-4,4'-diaminodifenilsulfona (Bu-DDS)

Rendimiento 73%; polvo blanco fino soluble en acetato de etilo, cloroformo y diclorometano; p. f. 143.144°C; RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ ppm 7.65 (A_2 , 4H, $J = 8.9$), 6.52 (X_2 , 4H, $J = 8.9$), 4.09 (sa, 2H, -NH-), 3.10 (cuádruple, 4H, - CH_2 -), 1.58 (quint, 4H, - CH_2 -), 1.40 (sext, 4H, - CH_2 -), 0.94 (t, 6H, - CH_3), ver Figs. 34 y 35; RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ ppm 151.5, 139.6, 129.1, 111.6, 43.0, 31.2, 20.1, 13.8 (Fig. 36); EMIE m/z : 360.15 calculada para $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$.

DDS-5
STANDARD 1H OBSERVE

Archive directory: /export/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory: auto_29Nov2007
File: PROTON

Pulse Sequence: s2pul

Solvent: cdcl3
Ambient temperature
Date : Nov 29 2007
Sample #5
Mercury-300 "cel"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 3.636 sec
Width 4800.8 Hz
40 repetitions
OBSERVE H1, 300.0751845 MHz
DATA PROCESSING
FT size 65536
Total time 3 min, 32 sec

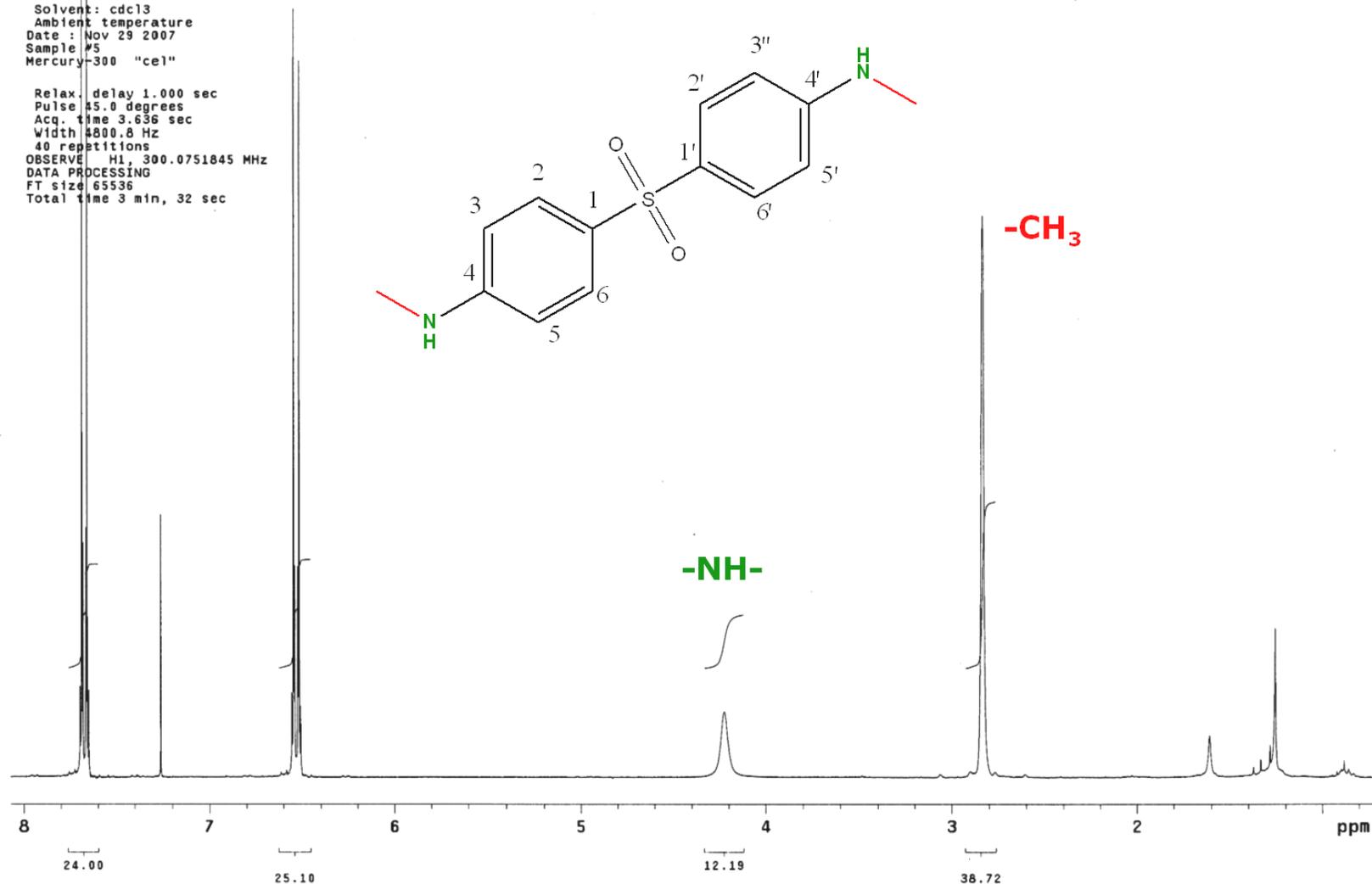


Figura 27. Espectro de RMN de ¹H de la N,N'-dimetil-4,4'-diaminodifenilsulfona (Me-DDS), obtenido en un equipo Varian mod. Mercury 300 a una frecuencia de 300 MHz en CDCl₃. Se indica en color la asignación tentativa en base a los efectos electrónicos de las señales correspondientes a la de los protones de los sustituyentes alquílicos y de los grupos amino presentes en la molécula.

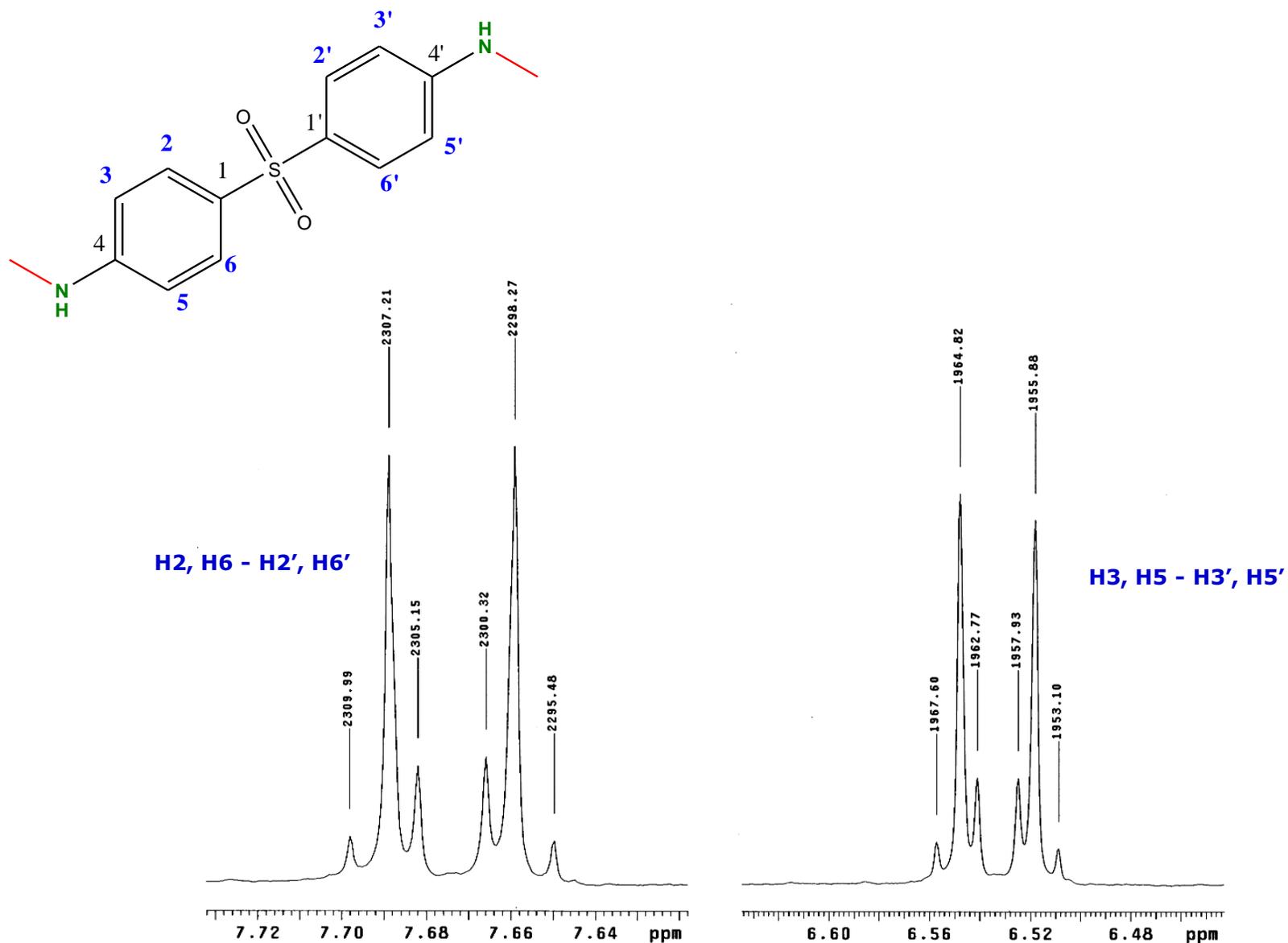


Figura 28. Ampliación de la región que comprende entre las 6 -8 ppm del espectro de RMN de ^1H de la *N,N'*-dimetil-4,4'-diaminodifenilsulfona (Me-DDS), obtenido en un equipo Varian mod. Mercury 300 operado a una frecuencia de 300 MHz en CDCl_3 . Se encuentran indicadas las asignaciones tentativas en base a los efectos electrónicos de los protones correspondientes al sistema A_2X_2 de los anillos aromáticos presentes en la molécula.

DDS-5
STANDARD 1H OBSERVE

Archive directory: /export/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory: auto_29Nov2007

Pulse Sequence: s2pu1

Solvent: cdcl3
Ambient temperature
Date : Nov 29 2007
Sample #5
File: 0502
Mercury-300 "ce1"

Relax. delay 2.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.764 sec
Width 16977.9 Hz
1792 repetitions
OBSERVE C13, 75.4539666 MHz
DECOUPLE H1, 300.0766856 MHz
Power 38 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 65536
Total time 5 hr, 21 min, 9 sec

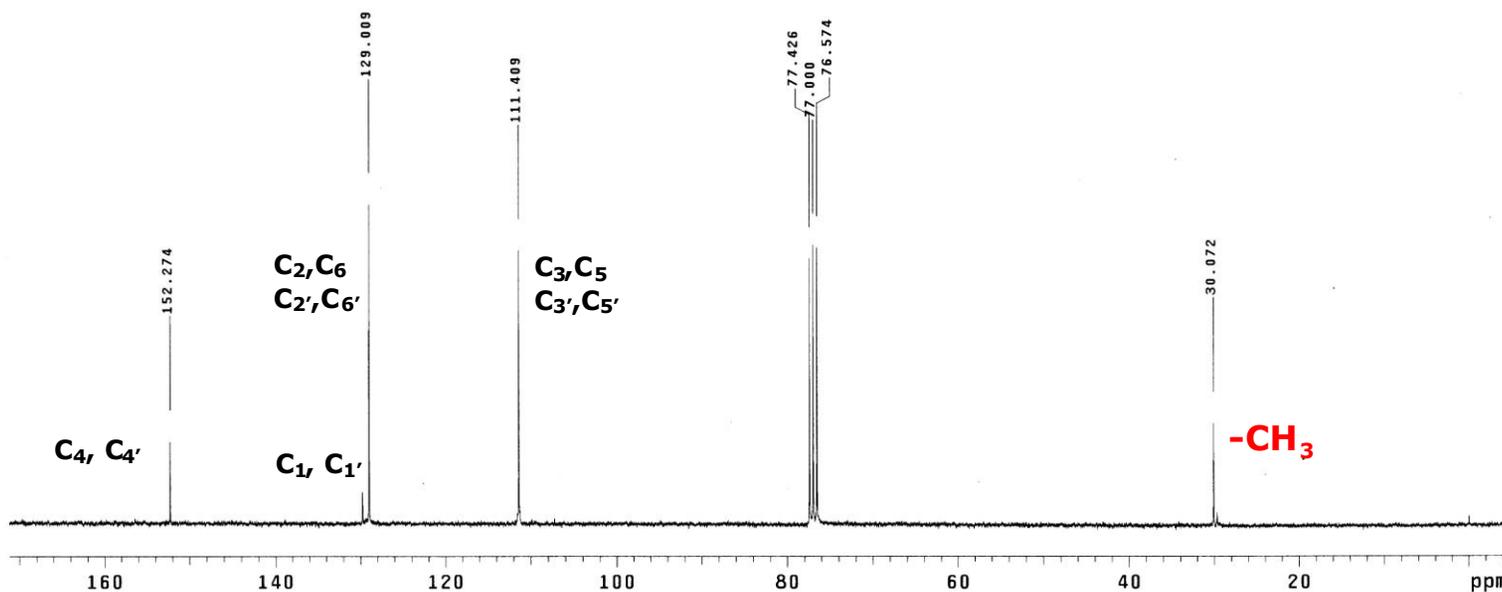
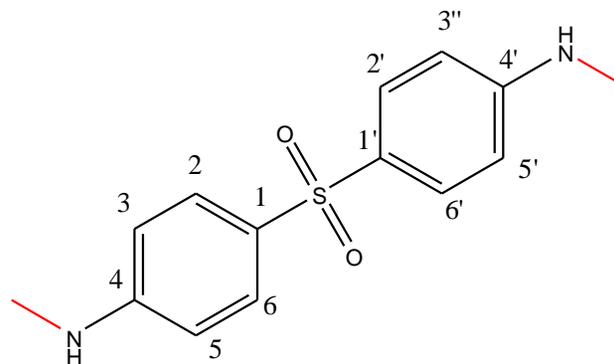


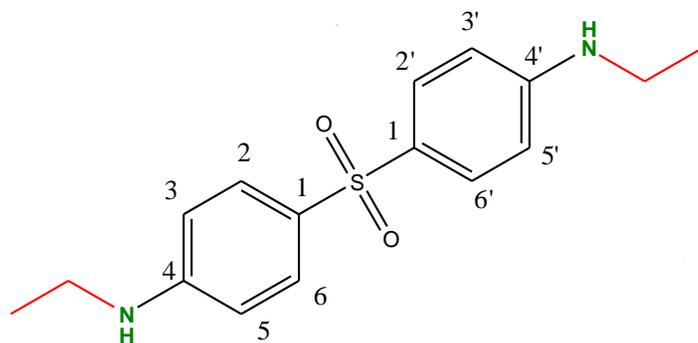
Figura 29. Espectro de RMN de ^{13}C de la N,N'-dimetil-4,4'-diaminodifenilsulfona (Me-DDS), obtenido en un equipo Varian mod. Mercury 300 operado a una frecuencia de 75.4 MHz en CDCl_3 . En el espectro se indican las asignaciones tentativas en base a los efectos electrónicos de las señales correspondientes a los carbonos de la molécula.

DOS-8
STANDARD 1H OBSERVE

Archive directory: /export/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory: auto_28Oct2008-22:19:48

Pulse Sequence: s2pu1
Solvent: cdcl3
Ambient temperature
Date : Oct 28 2008
Sample #2
File: 0401
Mercury-300 "ce1"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 3.636 sec
Width 4803.1 Hz
32 repetitions
OBSERVE H1, 300.0751857 MHz
DATA PROCESSING
FT size 65536
Total time 2 min, 52 sec



H2, H6 - H2',H6'

H3, H5 - H3', H5'

-NH-

-CH₂-

-CH₃

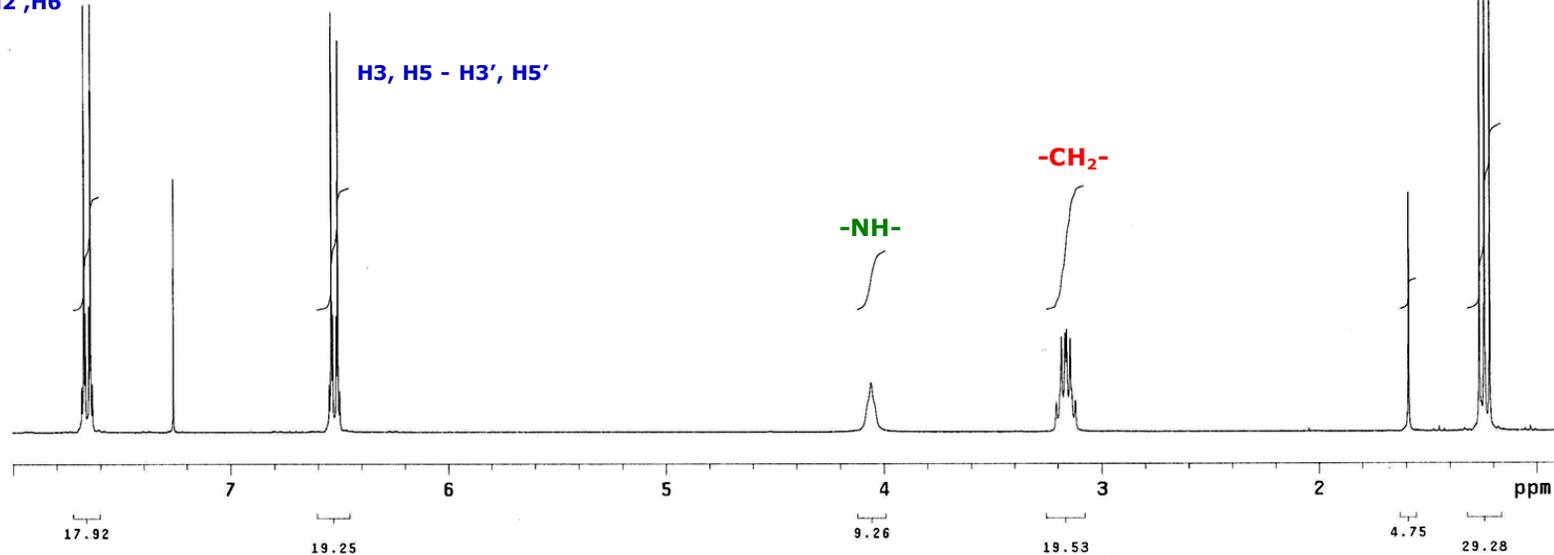


Figura 30. Espectro de RMN de ¹H de la N,N'-diethyl-4,4'-diaminodifenilsulfona (Et-DDS), obtenido en un equipo Varian mod. Mercury 300 a una frecuencia de 300 MHz en CDCl₃. Se indica en color la asignación tentativa en base a los efectos electrónicos de las señales correspondientes a la de los protones de los sustituyentes alquílicos y de los grupos amino presentes en la molécula.

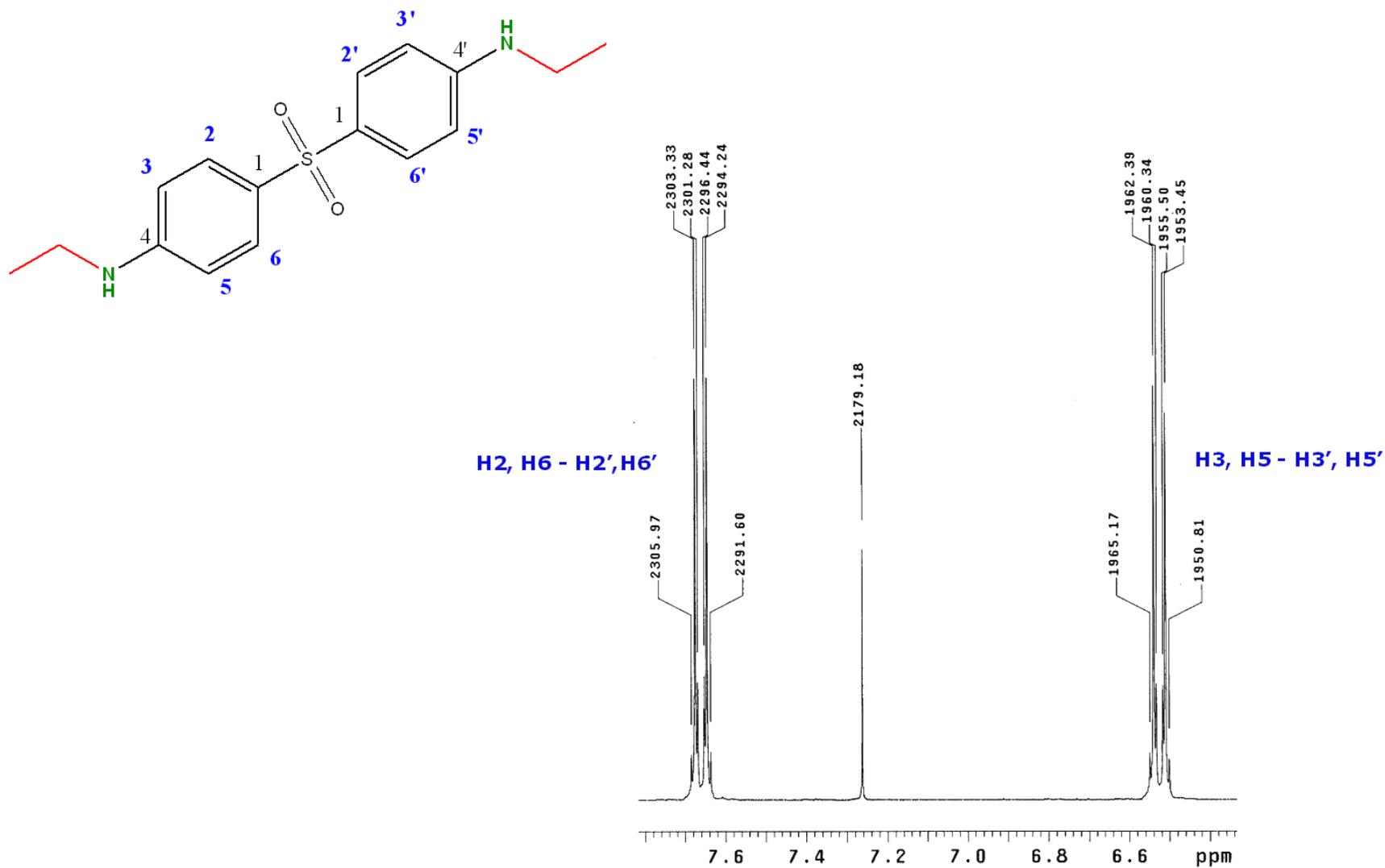


Figura 31. Ampliación de la región que comprende entre las 6 -8 ppm del espectro de RMN de ^1H de la *N,N'*-diethyl-4,4'-diaminodifenilsulfona (Et-DDS), obtenido en un equipo Varian mod. Mercury 300 operado a una frecuencia de 300 MHz en CDCl_3 . Se encuentran indicadas las asignaciones tentativas en base a los efectos electrónicos de los protones correspondientes al sistema A_2X_2 de los anillos aromáticos presentes en la molécula.

DDS-8
STANDARD 1H OBSERVE

Archive directory: /export/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory: auto_28Oct2008-22:19:48

Pulse Sequence: s2pu1

Solvent: cdc13
Ambient temperature
Date : Oct 28 2008
Sample #2
File: 0402
Mercury-300 "ce1"

Relax. delay 2.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.761 sec
Width 17006.8 Hz
11328 repetitions
OBSERVE C13, 75.4539664 MHz
DECOUPLE H1, 300.0766856 MHz
Power 38 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 65536
Total time 21 hr, 23 min, 26 sec

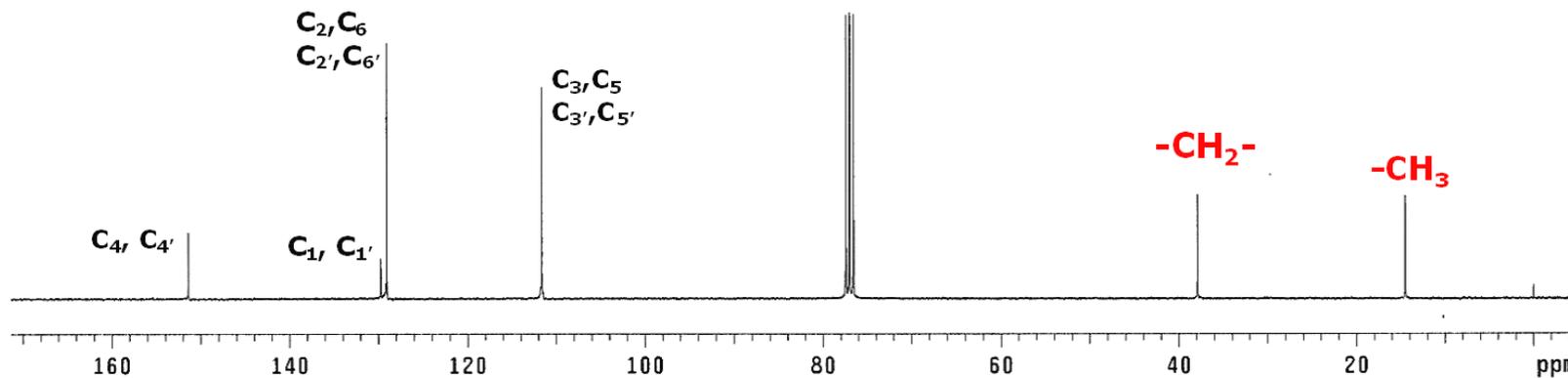
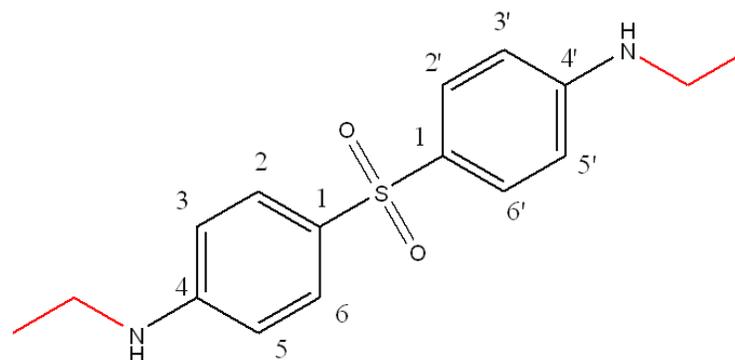


Figura 32. Espectro de RMN de ¹³C de la N,N'-diethyl-4,4'-diaminodifenilsulfona (Et-DDS), obtenido en un equipo Varian mod. Mercury 300 operado a una frecuencia de 75.4 MHz en CDCl₃. En el espectro se indican las asignaciones tentativas en base a los efectos electrónicos de las señales correspondientes a los carbonos de la molécula.

DDS-9
STANDARD 1H OBSERVE

INDEX	FREQUENCY	PPM	HEIGHT
1	1013.299	3.377	166.9

Archive directory: /export/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory: auto_12Dec2008

Pulse Sequence: s2pu1
Solvent: dms0
Ambient temperature
Date: Dec 12 2008
Sample #5
File: 0401
Mercury-300 "ce1"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 3.636 sec
Width 4803.1 Hz
32 repetitions
OBSERVE H1, 300.0766068 MHz
DATA PROCESSING
FT size 65536
Total time 2 min, 52 sec

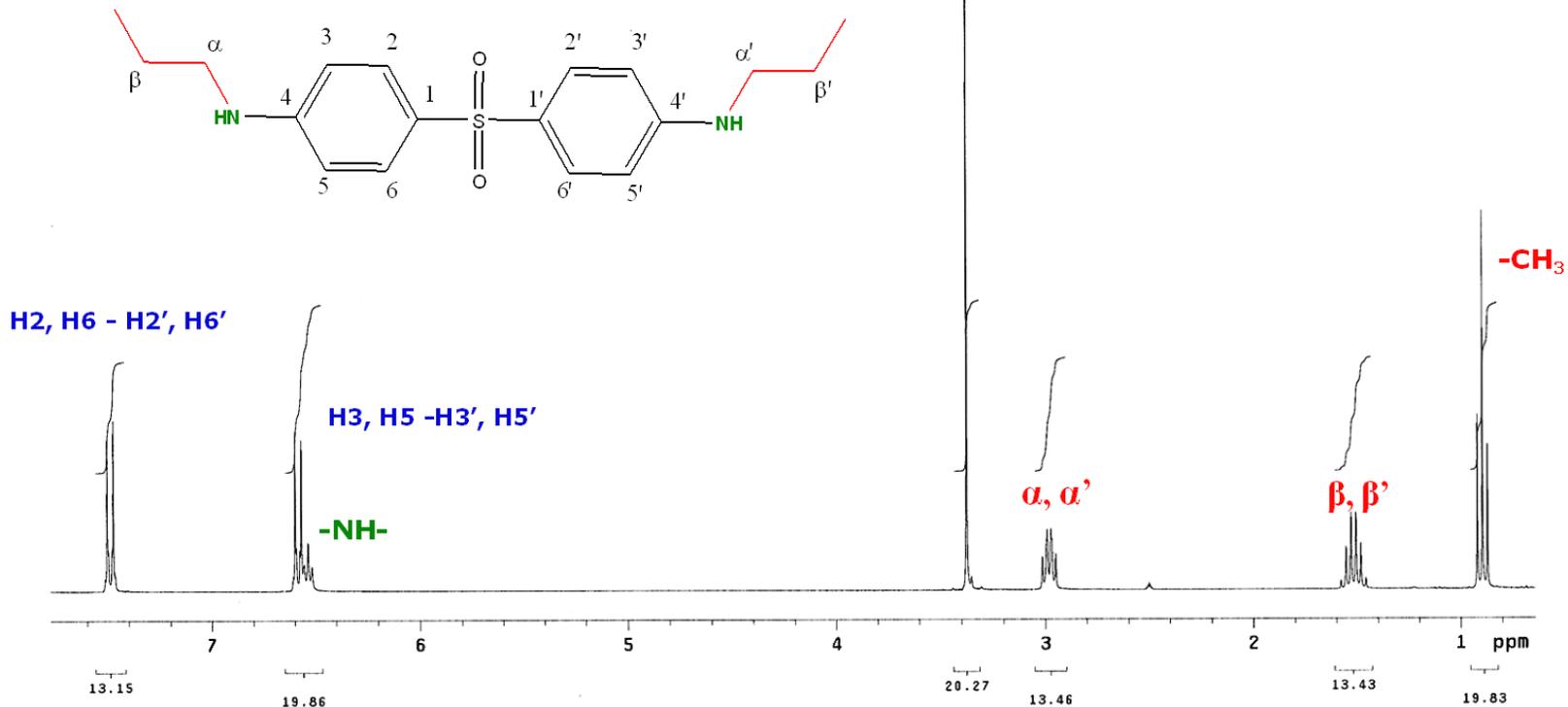


Figura 33. Espectro de RMN de ¹H de la N,N'-dipropil-4,4'-diaminodifenilsulfona (Pr-DDS), obtenido en un equipo Varian mod. Mercury 300 a una frecuencia de 300 MHz en DMSO deuterado. Se indica en color la asignación tentativa en base a los efectos electrónicos de las señales correspondientes a la de los protones de los sustituyentes alquílicos y de los grupos amino presentes en la molécula.

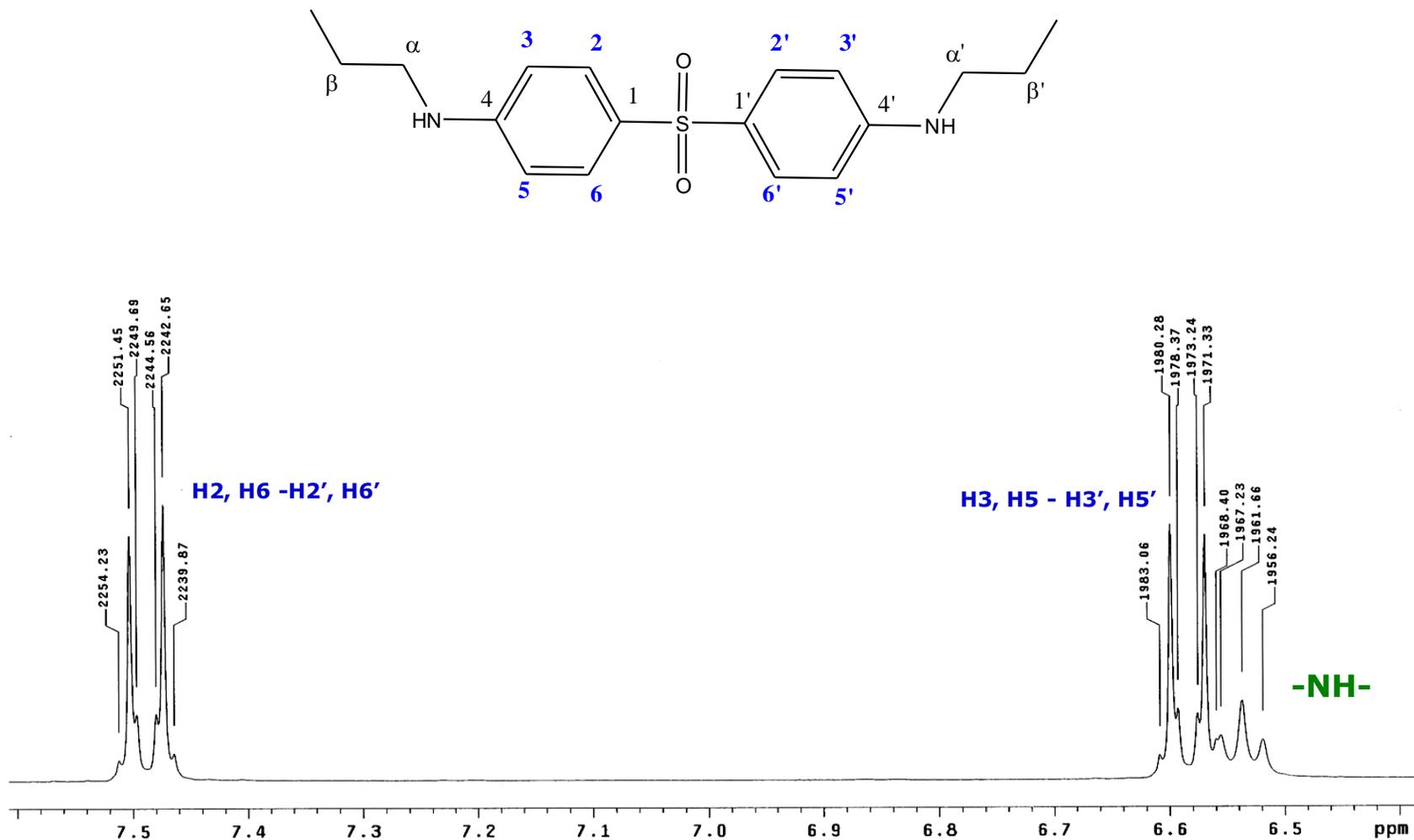


Figura 34. Ampliación de la región que comprende entre las 6 -8 ppm del espectro de RMN de ^1H de la N,N'-dipropil-4,4'-diaminodifenilsulfona (Pr-DDS), obtenido en un equipo Varian mod. Mercury 300 operado a una frecuencia de 300 MHz en DMSO deuterado. Se encuentran indicadas las asignaciones tentativas en base a los efectos electrónicos de los protones correspondientes al sistema A_2X_2 de los anillos aromáticos presentes en la molécula.

DDS-9
STANDARD 1H OBSERVE

Archive directory: /export/home/vnmr1/vnmrSYS/data
Sample directory: auto_12Dec2008

Pulse Sequence: s2pu1
Solvent: dms0
Ambient temperature
Date : Dec 12 2008
Sample #5
File: 0402
Mercury-300 "ce1"

Relax. delay 2.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.764 sec
Width 18867.9 Hz
25000 repetitions
OBSERVE C13, 75.4543567 MHz
DECOUPLE H1, 300.0781110 MHz
Power 38 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 131072
Total time 26 hr, 48 min, 5 sec

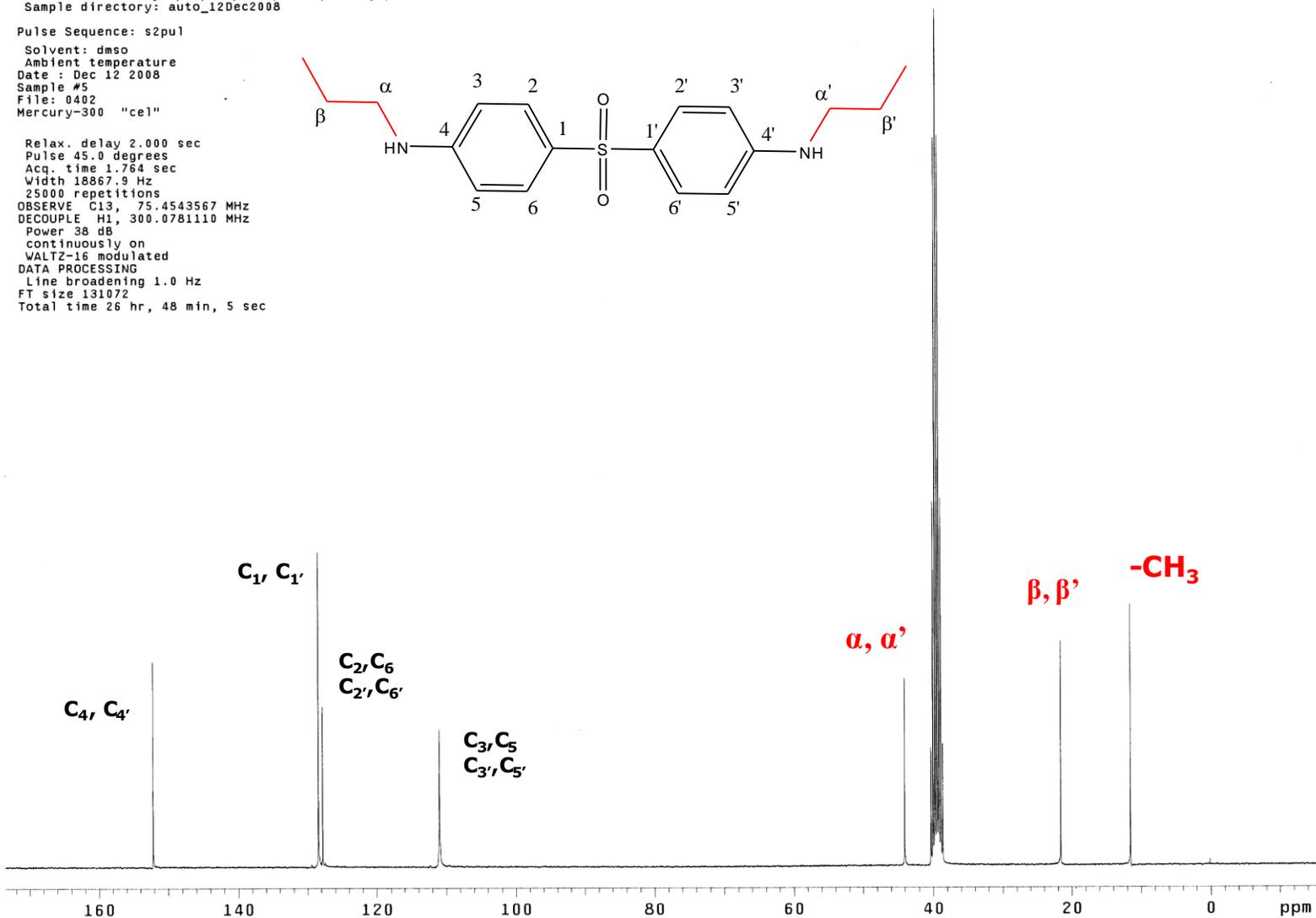


Figura 35. Espectro de RMN de ¹³C de la N,N'-dipropil-4,4'-diaminodifenilsulfona (Pr-DDS), obtenido en un equipo Varian mod. Mercury 300 operado a una frecuencia de 75.4 MHz en DMSO deuterado. En el espectro se indican las asignaciones tentativas en base a los efectos electrónicos de las señales correspondientes a los carbonos de la molécula.

DDS-10
 Pulse Sequence: s2pu1
 Solvent: cdcl3
 Ambient temperature
 Sample #6
 Mercury-300BB "auxiliar"
 Date :Nov 25 2008

Relax. delay 1.358 sec
 Pulse 60.5 degrees
 Acq. time 3.642 sec
 Width 4496.4 Hz
 40 repetitions
 OBSERVE H1, 300.0441673 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 32768
 Total time 3 min, 57 sec

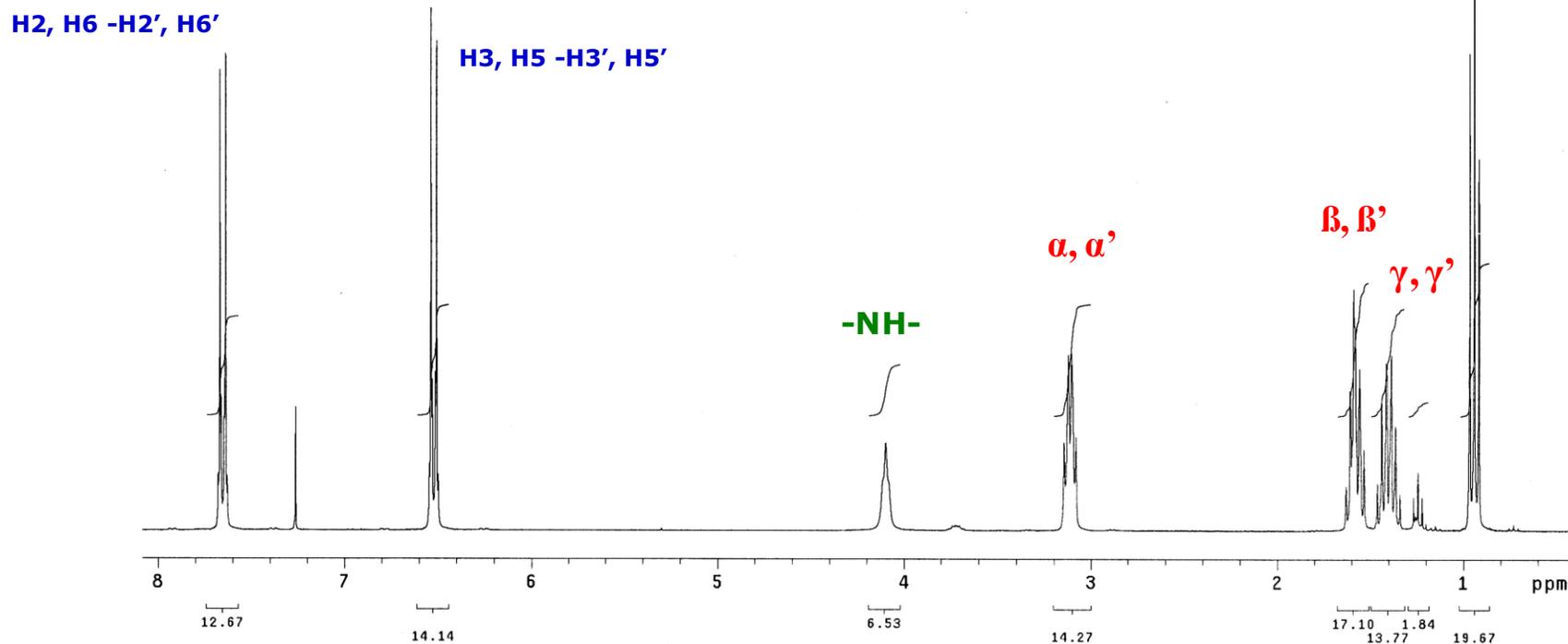
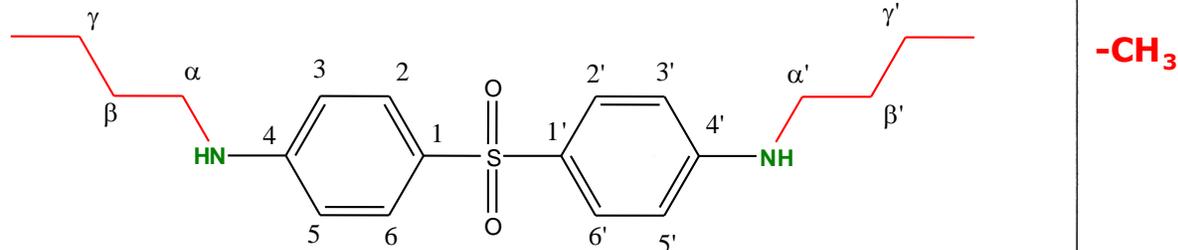


Figura 36. Espectro de RMN de ^1H de la N,N'-dibutil-4,4'-diaminodifenilsulfona (Bu-DDS), obtenido en un equipo Varian mod. Mercury 300 a una frecuencia de 300 MHz en CDCl_3 . Se indica en color la asignación tentativa en base a los efectos electrónicos de las señales correspondientes a la de los protones de los sustituyentes alquílicos y de los grupos amino presentes en la molécula.

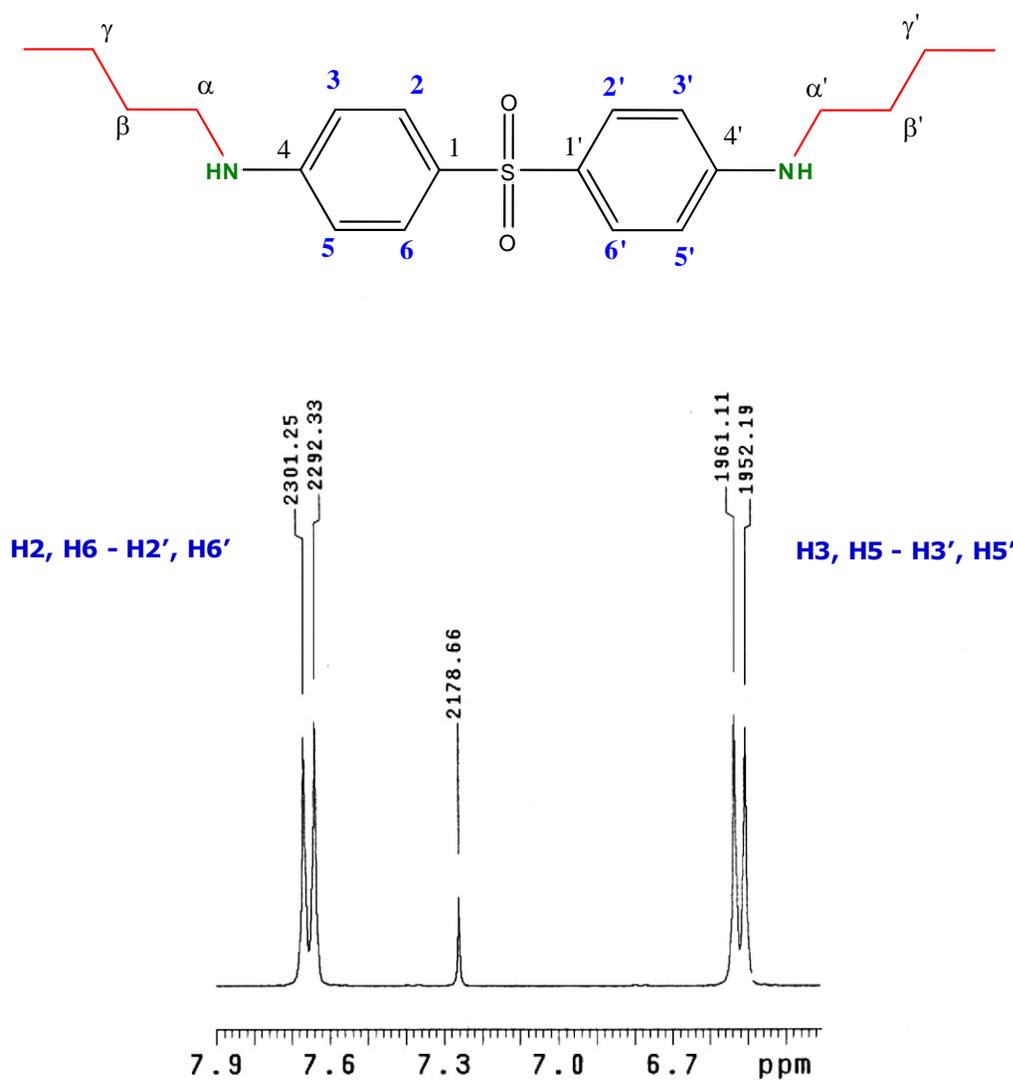


Figura 37. Ampliación de la región que comprende entre las 6 -8 ppm del espectro de RMN de ^1H de la *N,N'*-dibutil-4,4'-diaminodifenilsulfona (Bu-DDS), obtenido en un equipo Varian mod. Mercury 300 operado a una frecuencia de 300 MHz en CDCl_3 . Se encuentran indicadas las asignaciones tentativas en base a los efectos electrónicos de los protones correspondientes al sistema A_2X_2 de los anillos aromáticos presentes en la molécula.

DDS_10
STANDARD 1H OBSERVE

Archive directory: /export/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory: auto_19Nov2008

Pulse Sequence: s2pu1
Solvent: cdc13
Ambient temperature
File: 0602
Mercury-300BB "auxiliar"
Date :Nov 19 2008

Relax. delay 2.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.767 sec
Width 15822.8 Hz
5000 repetitions
OBSERVE C13, 75.4461667 MHz
DECOUPLE H1, 300.0456226 MHz
Power 33 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 65536
Total time 5 hr, 21 min, 6 sec

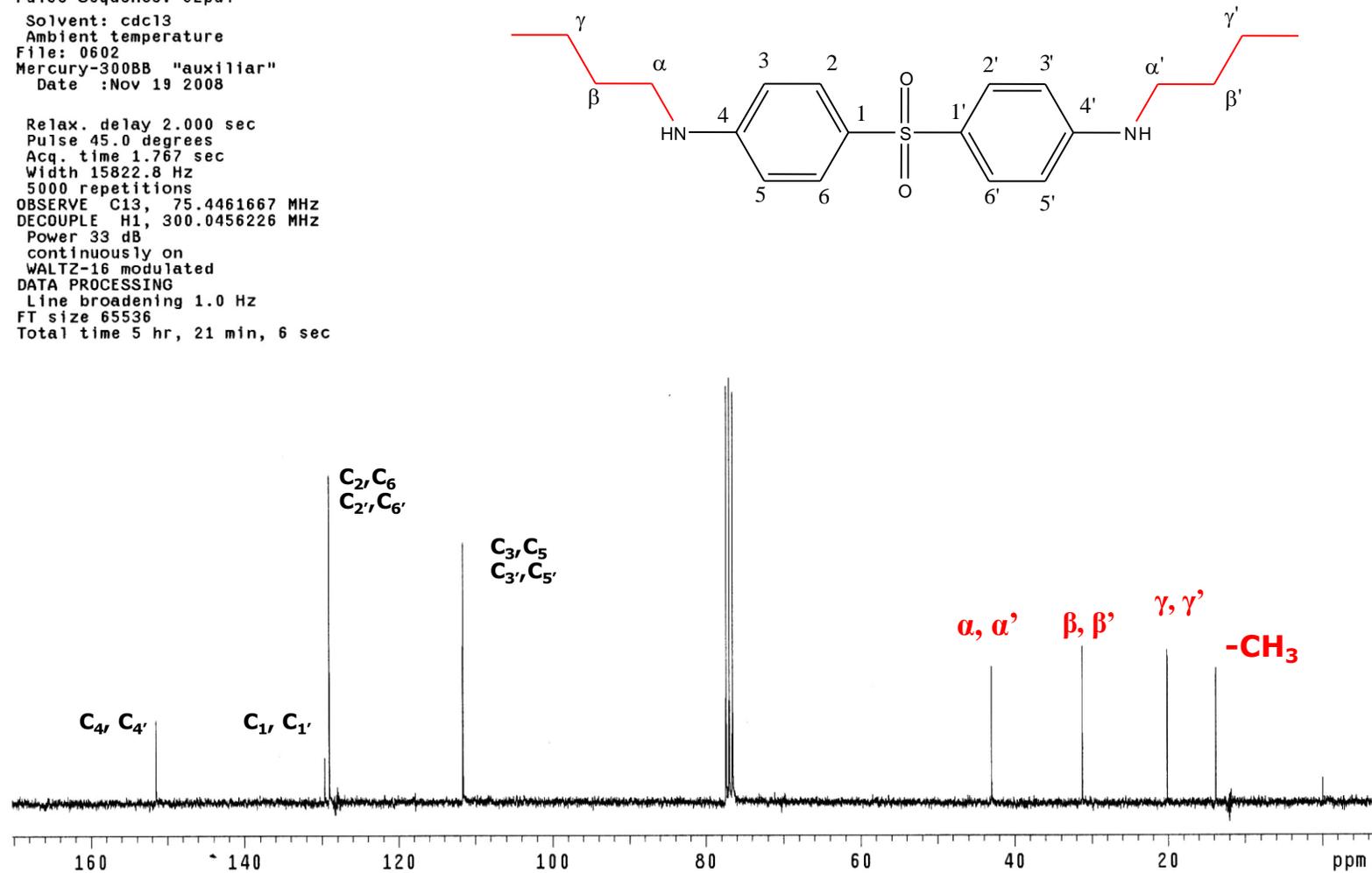


Figura 38. Espectro de RMN de ¹³C de la N,N'-dibutil-4,4'-diaminodifenilsulfona (Bu-DDS), obtenido en un equipo Varian mod. Mercury 300 operado a una frecuencia de 75.4 MHz en CDCl₃. En el espectro se indican las asignaciones tentativas en base a los efectos electrónicos de las señales correspondientes a los carbonos de la molécula.

6.2. EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA

6.2.1. Conducta de giro

Los cuatro análogos N,N'-dialquilados y el intermediario N,N'-ditosilado tuvieron un conteo de giros significativamente inferior ($p < 0.05$) al grupo control de daño, alcanzando una disminución hasta del 67% en la frecuencia de los giros para el grupo tratado con el análogo N,N'-dimetilado. La molécula que mostró menor protección contra la frecuencia de giro fue el análogo N,N'-dietilado el cual solamente redujo los giros en un 35% . El grupo sham no mostró conducta de giro (Fig. 39).

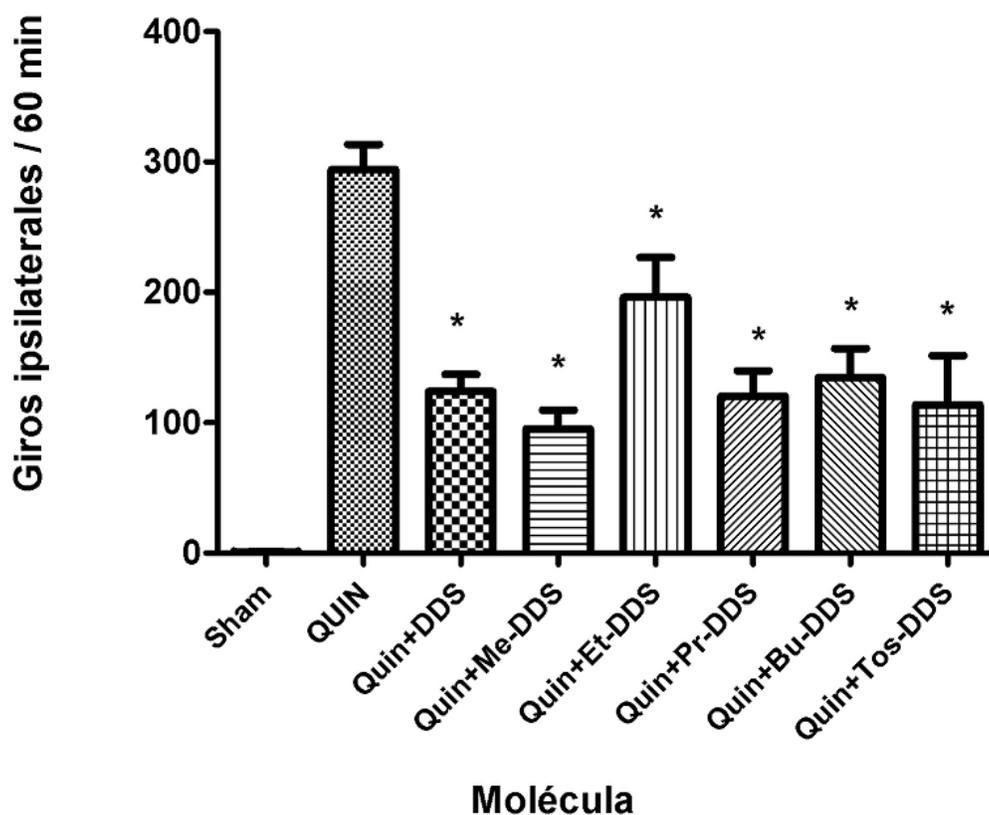


Figura 39. Número de giros ipsilaterales. Todos los análogos demostraron una disminución significativa en la frecuencia de giro con respecto al grupo lesionado con QUIN (Prueba de U de Mann-Whitney, $*p < 0.05$). No se observaron giros en el grupo sham ($n = 8-12$).

6.2.2. Determinación de GABA intraestriatal

La reducción en el contenido intraestriatal de GABA del grupo control de daño (QUIN) con respecto al sham, alcanzó hasta un 80.5% (Fig.40). Los compuestos que mostraron la

menor disminución en los niveles intraestriatales de GABA fueron la DDS y el análogo N,N'-dietilado disminuyendo el contenido del aminoácido aproximadamente en un 50% con respecto al grupo control (sham). Los análogos N,N'-dipropilado y N,N'-ditosilado, no alcanzaron una preservación significativa en los niveles del aminoácido con respecto al grupo sham, oscilando su disminución entre el 65 y el 75%, porcentajes cercanos a la disminución observada en el grupo control de daño (QUIN).

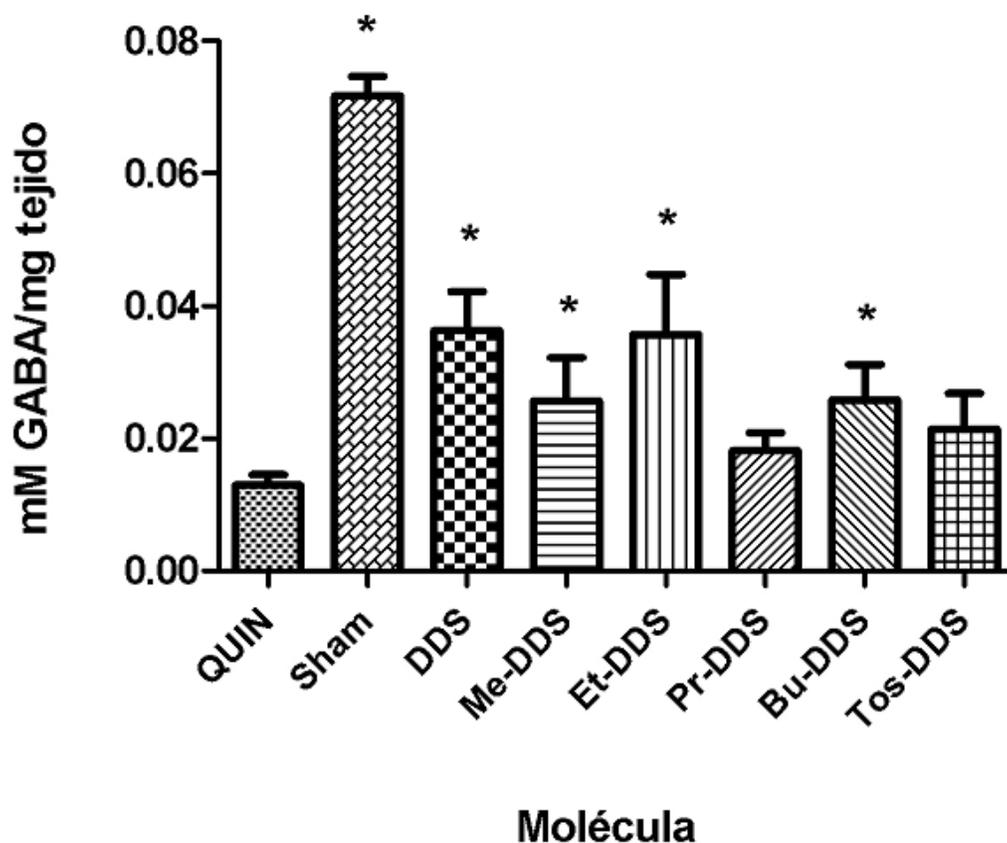


Figura 40. Niveles de contenido de GABA estriatal. Los análogos N, N'-dimetilado, N, N'-dietilado y N,N'-dibutilado mostraron una diferencia significativa (Prueba de U de Mann-Whitney, * $p < 0.05$, $n = 8-12$) en la preservación del aminoácido con respecto al grupo control de daño (QUIN).

Con la finalidad de corroborar la correlación entre las mediciones del contenido de GABA estriatal y el número de giros, se realizó una prueba de correlación bivariada no paramétrica de Spearman, obteniendo un coeficiente de Rho de -0.487 con una significancia estadística de $p < 0.01$, demostrando la relación negativa entre las variables (Fig. 41).

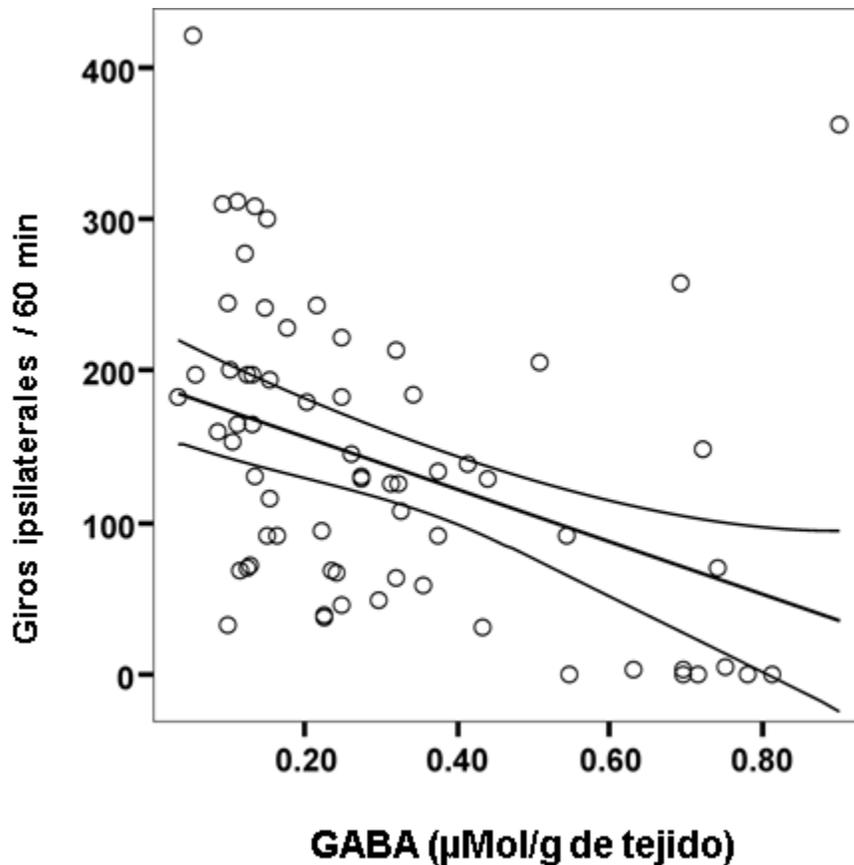


Figura 41. Correlación negativa entre el contenido estriatal de GABA y el número de giros ipsilaterales. (Rho de Spearman = -0.487, $p < 0.01$).

6.2.3. Cocientes de concentración líquido cefalorraquídeo-plasma

En la figura 42 se muestran los cromatogramas tipo de las muestras “blanco” de líquido cefalorraquídeo y plasma, respectivamente, y en la figura 43, se muestran cromatogramas tipo de estándares preparados en LCR y plasma, respectivamente, con DDS y los análogos evaluados.

Se obtuvieron para las curvas de calibración de 7 puntos (0.1-8 µg/mL para DDS y equimolares para análogos) en fase móvil y plasma, coeficientes de regresión (r) para todas las moléculas de al menos 0.99 y coeficientes de variación de lecturas por triplicado de los puntos más bajos de las curvas inferiores al 11% para todas las moléculas.

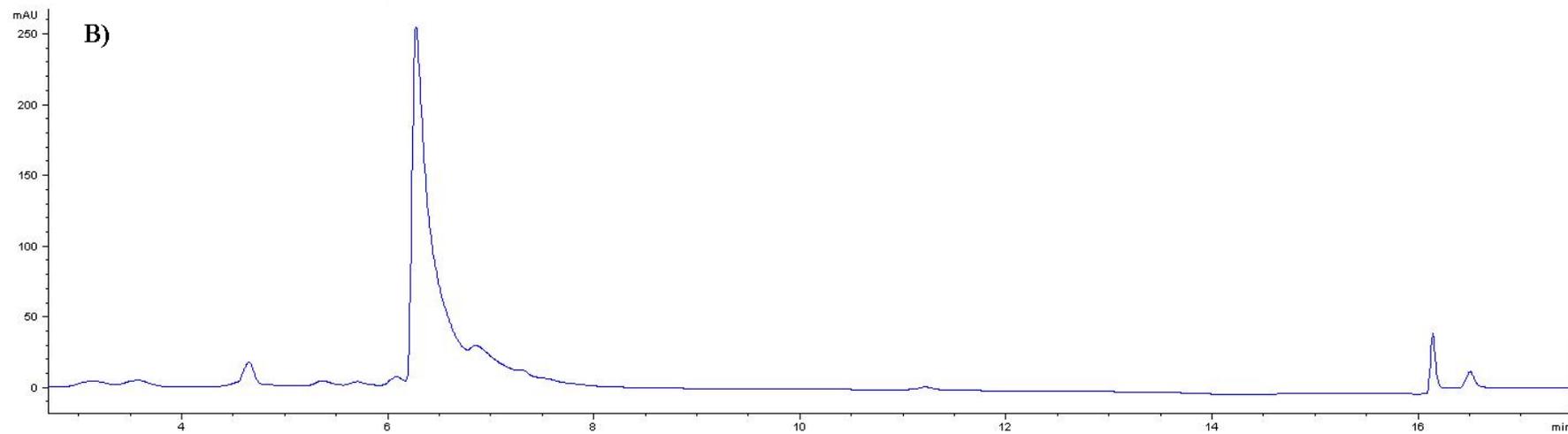
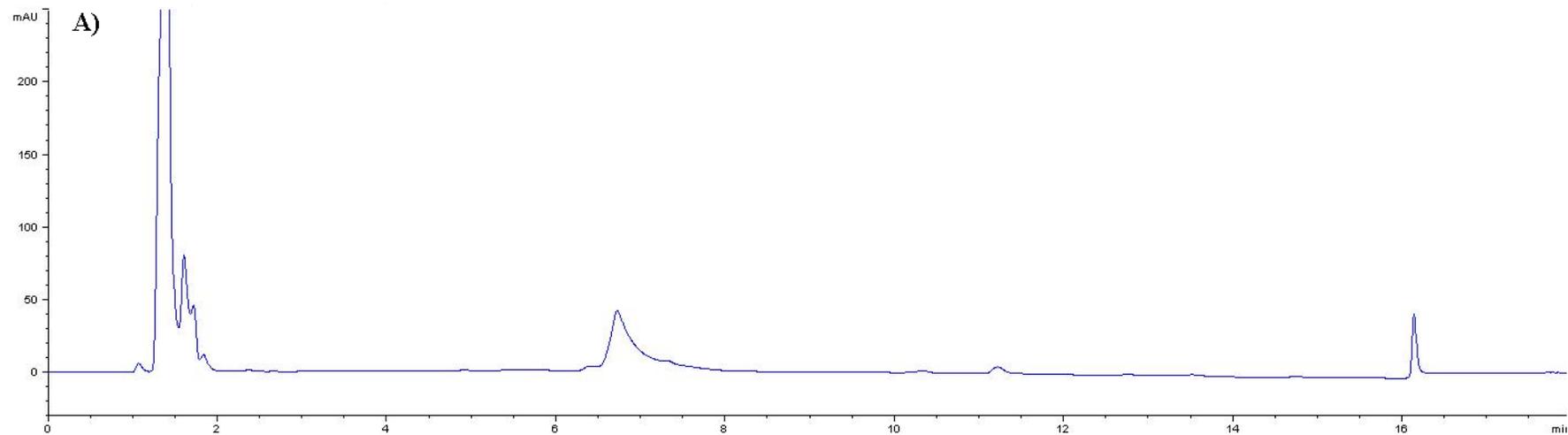


Figura 42. Cromatogramas tipo de muestras blanco de: A) Líquido ceforraquídeo y B) plasma

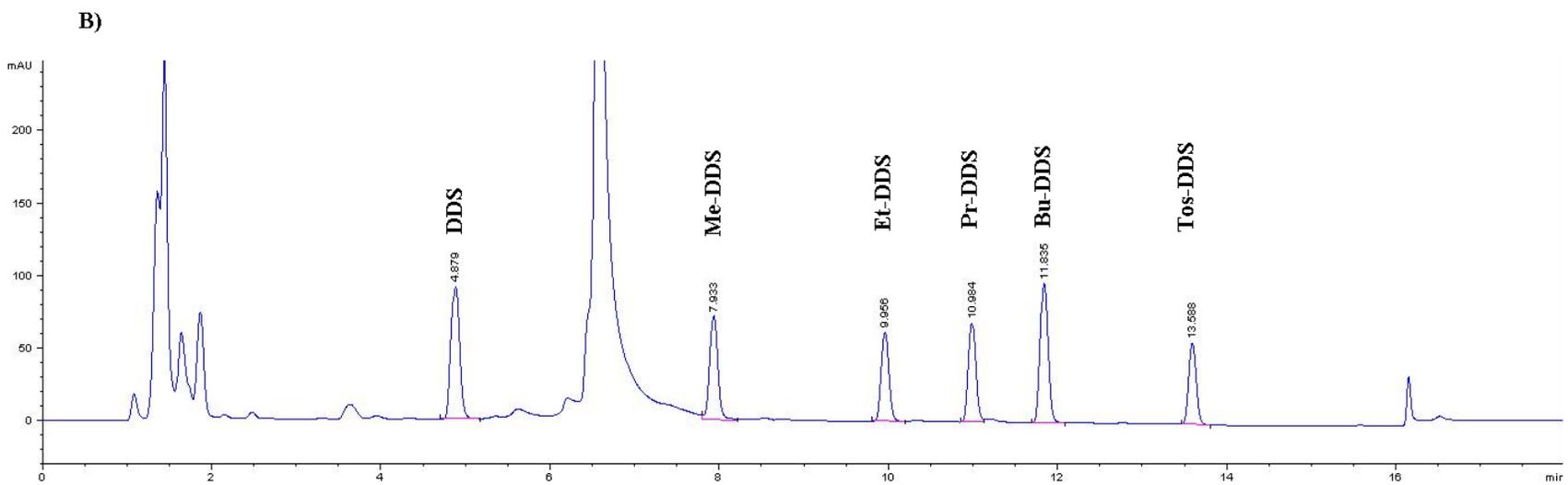
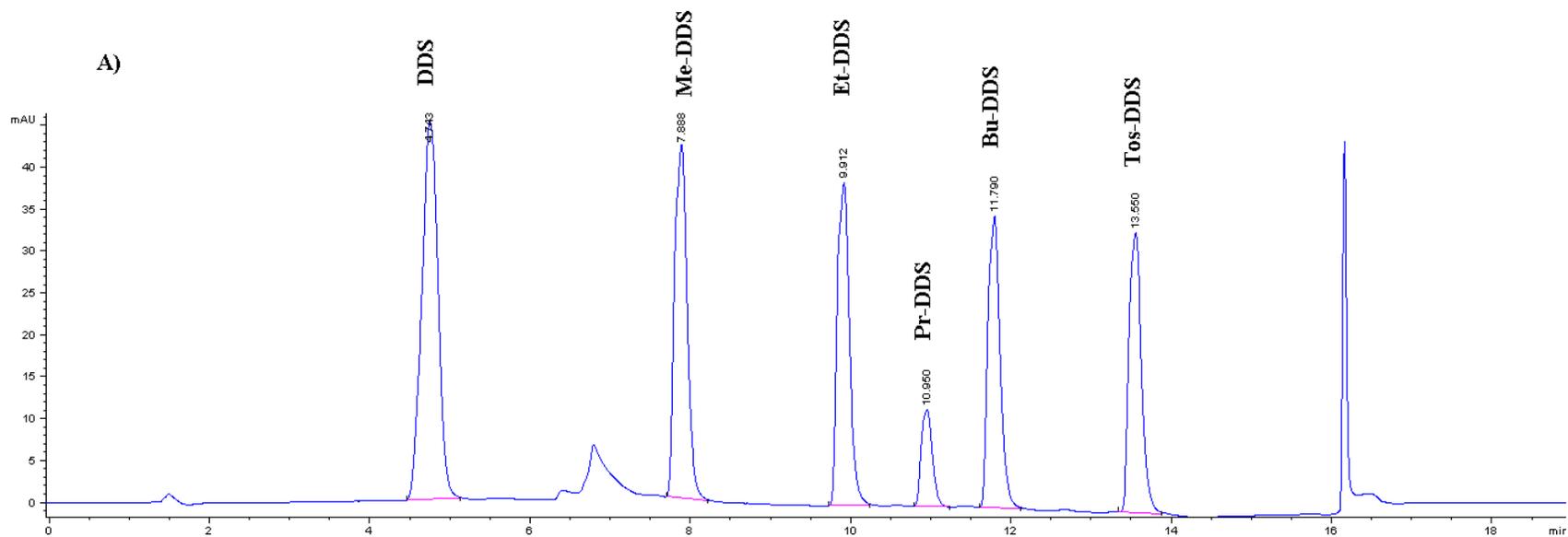


Figura 43. Cromatogramas tipo de muestras estándar para calibración de DDS y análogos en: A) Líquido cefalorraquídeo y B) plasma.

La determinación de los cocientes de concentración de DDS LCR/plasma derivada del metabolismo de las moléculas en estudio, demostró que los grupos a los cuales se administraron los análogos N,N'-dietilado y el N,N'-dibutilado muestran un comportamiento similar al de los administrados con la DDS, mientras que los grupos a los que se les administraron los análogos N,N'-dimetilado, N,N'-dipropilado y N,N'-ditosilado tuvieron cocientes menores con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) al grupo que recibió la molécula original (Fig. 44).

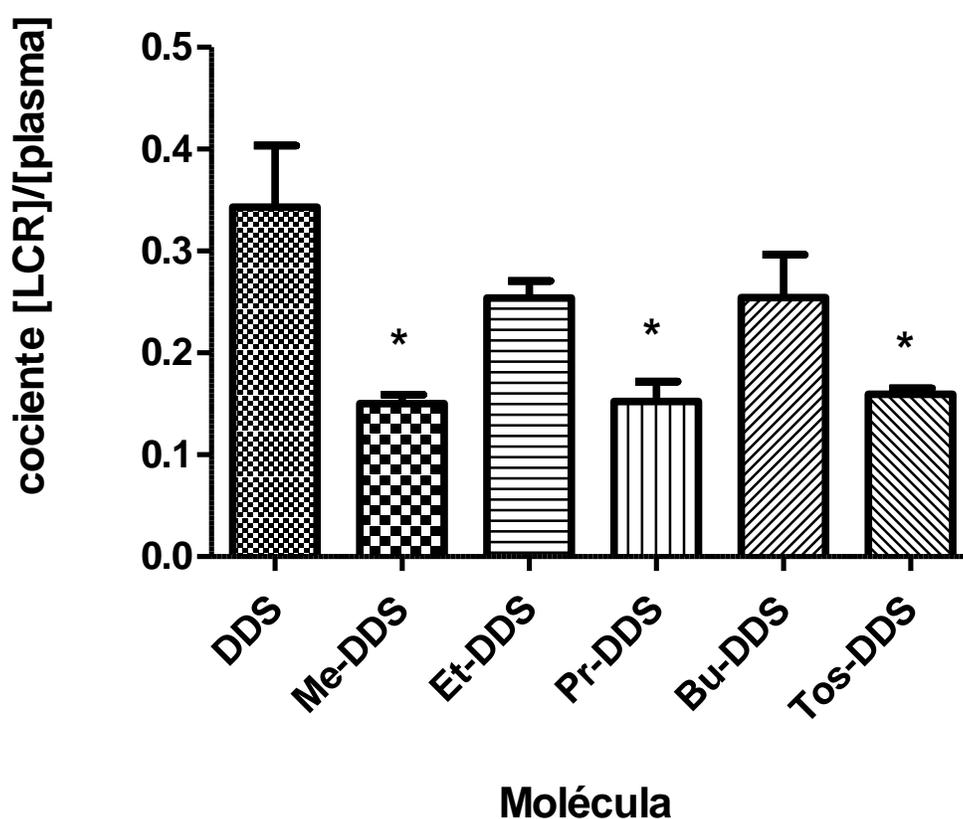


Figura 44. Cocientes de concentración de dapsona LCR/plasma producidos por la administración de dapsona a 12.5 mg/kg y de dosis equimolares de los análogos en estudio (Prueba de U de Mann Whitney, * $p < 0.05$, $n = 5-6$).

Aunque se intentó obtener el cociente de concentración LCR/plasma de los análogos de DDS en evaluación farmacológica, éste no pudo ser calculado para todas las moléculas. Los análogos N,N'-dipropilado, N,N'-dibutilado y N,N'-ditosilado, no alcanzaron a ser

identificables del ruido de fondo en las muestras de LCR. El cociente obtenido para los análogos N,N'-dimetilado y N,N'-dietilado fue estadísticamente significativo en relación al registrado en el grupo experimental que recibió la molécula original (Fig. 45).

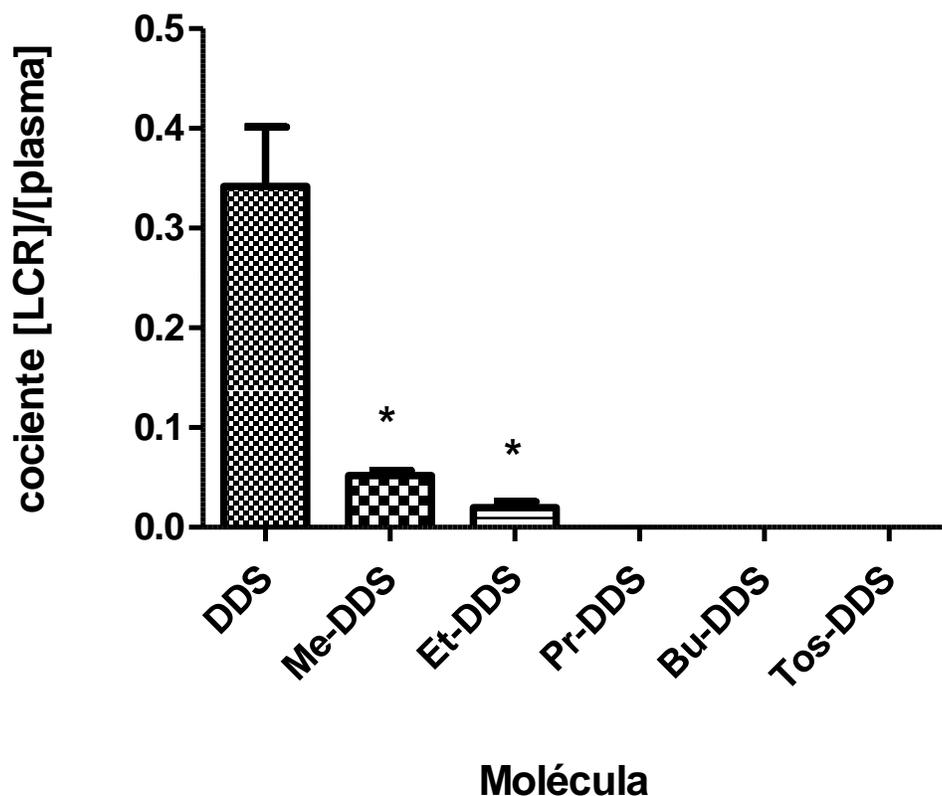


Figura 45. Cocientes de concentración producidos por las moléculas evaluadas en LCR/plasma (Prueba de U de Mann Whitney, * $p < 0.05$, $n = 5-6$).

6.3. EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA

6.3.1. Perfiles de porcentaje de metahemoglobina contra tiempo

Los perfiles de porcentaje de metahemoglobina contra tiempo obtenidos se muestran en la figura 46.

El área bajo la curva de todos los análogos fue significativamente más baja con respecto al área del perfil generado en el grupo que recibió DDS. El análogo N,N'-dimetilado registró la disminución más discreta en la formación de hemoglobina (31.5%), mientras que el

análogo ditosilado fue la molécula que demostró tener una mayor inhibición en la oxidación de la hemoglobina alcanzando una reducción del 70.6% con respecto a el área bajo la curva obtenida en el grupo administrado con la molécula original (Fig.47).

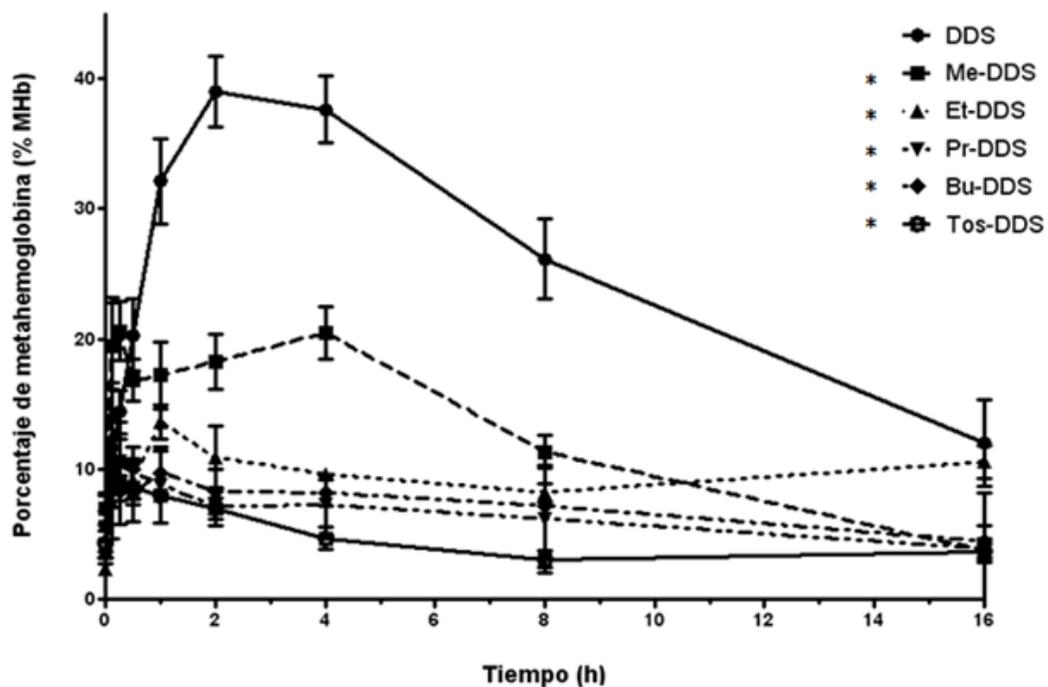


Figura 46. Perfiles de porcentaje de metahemoglobina contra tiempo obtenidos durante 16 horas posteriores a la administración de DDS a 25 mg/kg y de dosis equimolares de los análogos en estudio (Prueba de U de Mann-Whitney, * $p < 0.05$, $n = 6-8$).

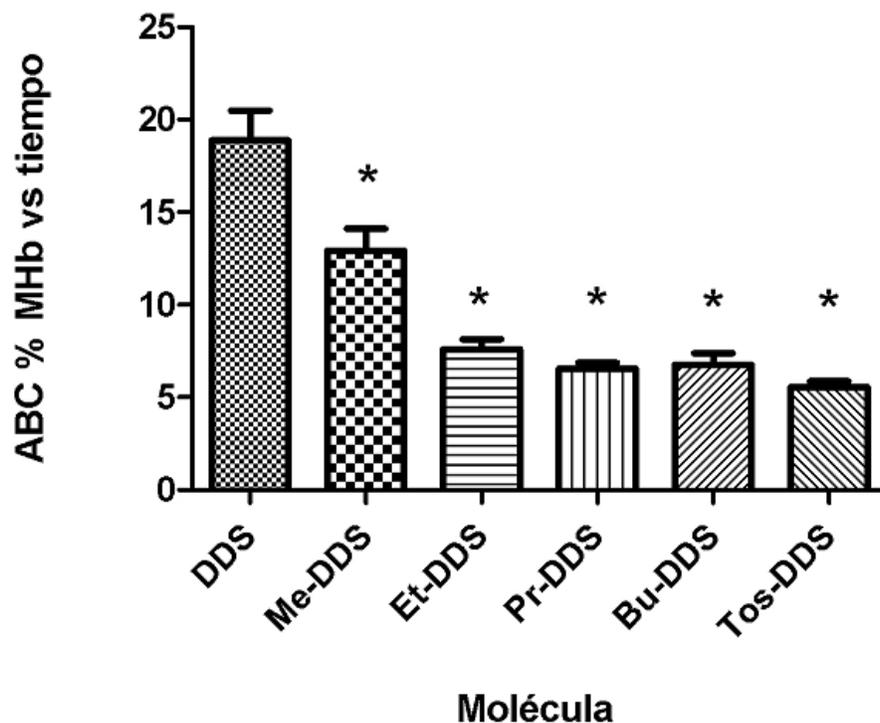


Figura 47. Área bajo la curva (ABC) obtenida de los perfiles de porcentaje de metahemoglobina contra tiempo (n = 6-8). Todos los análogos mostraron una reducción estadísticamente significativa al comparar contra el área bajo la curva producida por la dapsona (Prueba de U de Mann-Whitney, *p<0.05).

6.4. COCIENTE DE SEGURIDAD (EFECTIVIDAD/TOXICIDAD)

Con los datos de la prueba de conducta de giro (número de vueltas ipsilaterales) y de los perfiles de porcentaje de metahemoglobina contra tiempo (Área bajo la curva), se determinó un cociente de seguridad para cada una de las moléculas en estudio definido como:

$$\text{Cociente de seguridad} = \frac{\text{Promedio del número de vueltas ipsilaterales}}{\text{Promedio del ABC de metahemoglobina}}$$

Dicha razón de efectividad/toxicidad se normalizó para fines de comparación entre las moléculas considerando el cociente obtenido a partir de los datos de la dapsona como 1. Los cocientes calculados se muestran en la tabla 3.

TABLA 3. Cocientes de seguridad (efectividad/toxicidad) de las moléculas evaluadas.

Molécula	Cociente de seguridad (Prom. número de vueltas ipsilaterales/ Prom. ABC MetHb)	Normalización del cociente
DDS	6.56	1
Me-DDS	7.36	1.12
Et-DDS	3.93	0.59
Pr-DDS	2.80	0.42
Bu-DDS	3.04	0.46
Tos-DDS	3.13	0.47

7. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluó el efecto neuroprotector de una serie homóloga de cuatro análogos N,N'-dialquilados de la dapsona además de un intermediario N,N'-ditosilado en un modelo de excitotoxicidad inducida por la inyección intraestriatal de QUIN en ratas Wistar macho adultas.

Los cuatro análogos N,N'-dialquilados de la dapsona evaluados (N,N'-dimetildapsona, N,N'-dietildapsona, N,N'-dipropildapsona y N,N'-dibutildapsona), fueron diseñados para conservar las propiedades fisicoquímicas que permitieran su paso a través de la barrera hematoencefálica de acuerdo a los parámetros de van der Waterbeemd, al tener un peso molecular menor a los 400 daltons, un área superficial polar total menor a 90° Å y un LogP entre 1 y 4 (tabla 4) [109]. El intermediario de reacción N,N'-ditosilado fue evaluado de manera adicional, ya que la hidrólisis de los grupos tosilo a nivel metabólico podrían atribuirle propiedades como un pro-fármaco, además de que existe evidencia previa de que algunas moléculas incrementan sus propiedades neuroprotectoras ante la toxicidad causada por agonistas de los receptores NMDA y AMPA *in vitro* e *in vivo* al ser tosiladas [110].

TABLA 4. Propiedades estructurales de los cuatro análogos propuestos, relacionadas con el paso a través de la barrera hematoencefálica. Los parámetros de peso molecular, LogP, área superficial polar total (ASPt) fueron calculados con el paquete ChemBioDraw Ultra v. 12.0 de ChemOffice 2010.

Análogo	Peso molecular (Da)	Coefficiente de partición octanol/agua LogP	Área superficial polar total (Å)
Me-DDS	276.35	1.92	58.2
Et-DDS	304.41	2.59	58.2
Pr-DDS	332.46	3.57	58.2
Bu-DDS	360.51	4.40	58.2

La síntesis de los cuatro análogos propuestos para su evaluación farmacológica se realizó en tres pasos (Fig. 48):

- 1) N,N'-ditosilación de la 4,4'-diaminodifenilsulfona
- 2) N,N'-dialquilación de la N,N'-ditosildapsona
- 3) Hidrólisis ácida de los grupos tosilo.

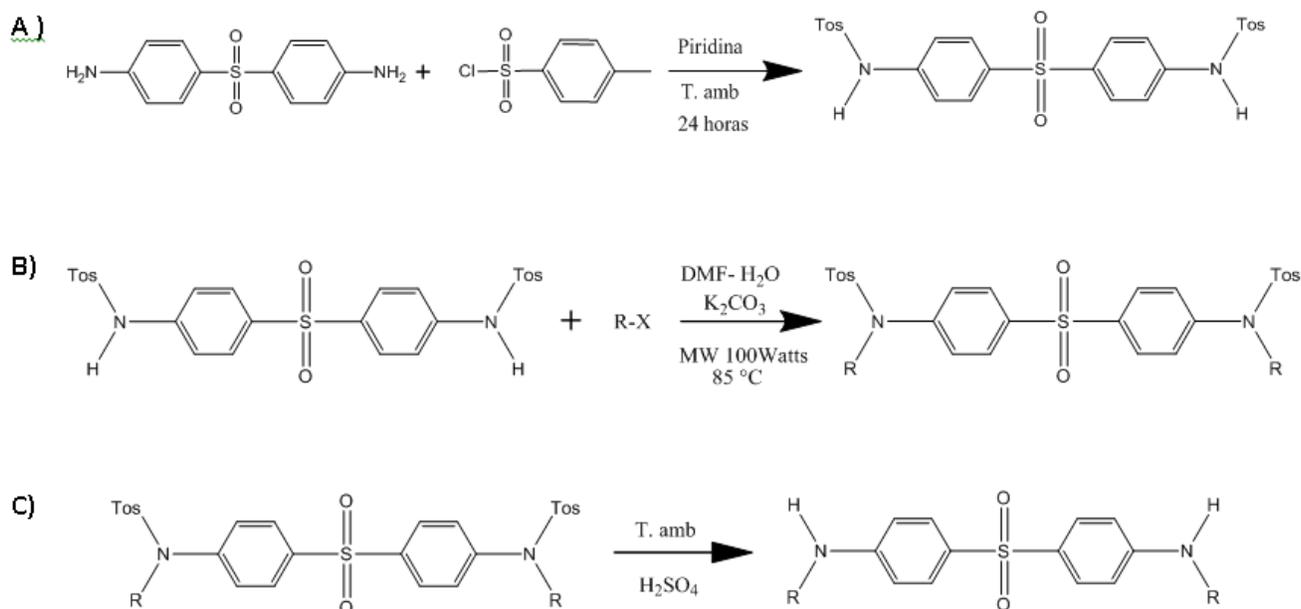


Figura 48. Síntesis propuesta para la obtención de análogos N,N'-dialquilados. A) N,N'-ditosilación de 4,4'-diaminodifenilsulfona. B) N,N'-dialquilación de intermediario N,N'-ditosilado. C) Hidrólisis ácida de los grupos tosilo. (R= Me, Et, Pr, Bu).

La mono-alquilación de aminas aromáticas constituye un problema debido a que se trata de bases más débiles en comparación con aminas de naturaleza alifática. Dicha disminución en su basicidad se debe a la deslocalización sobre los enlaces π de los anillos aromáticos por resonancia en la estructura del par aislado de electrones libre del nitrógeno en el grupo amino [111].

La ruta de síntesis propuesta en este trabajo, está diseñada para lograr la monoalquilación de los grupos amino de la dapsona. La reacción de sustitución por la cual se añade el grupo tosilo de manera simétrica en el primer paso de nuestra ruta sintética aumenta la acidez del protón restante en el grupo amino, favoreciendo su salida cuando el par de electrones libre del grupo amino ataca al nucleófilo (halogenuro de alquilo) en la segunda etapa de la síntesis (S_N2). De manera adicional, los grupos tosilo añadidos simétricamente a la DDS, proveen de un impedimento estérico que evita la posibilidad de cualquier polialquilación en la reacción con los halogenuro de alquilo con un menor tamaño de cadena alifática [112].

Aunque en una primera etapa del trabajo experimental de tesis se evaluó la obtención de las moléculas propuestas mediante la preparación de iminas (bases de Schiff) al llevar a cabo una sustitución nucleofílica bimolecular simétrica entre los grupos aminos de la DDS con el aldehído que añadiera el sustituyente deseado al reducir posteriormente la imina formada, los rendimientos globales de reacción obtenidos no superaron el 7% para ninguna de las moléculas propuestas, siendo incluso bastante menores para los análogos con los sustituyentes más grandes (Pr-DDS y Bu-DDS).

Los rendimientos obtenidos mediante la ruta de síntesis mencionada en la sección de métodos de este trabajo de tesis generaron rendimientos de reacción globales de entre el 27% para el análogo N,N'-dibutilado y 40% para el análogo N,N'-dimetilado. Es necesario recalcar que la utilización de un sistema de microondas para realizar la segunda etapa de la síntesis propuesta (reacción S_N2 con el halogenuro de alquilo deseado), incrementó los rendimientos en más del 300% y disminuyó el tiempo de reacción en más de dos terceras partes para todos los intermediarios con respecto al método tradicional utilizando como fuente de calor una parrilla eléctrica. El calentamiento de un sistema de reacción con microondas no se encuentra limitado por la conductividad térmica del recipiente en el que se lleva a cabo la reacción, por lo que se logra un sobrecalentamiento instantáneo y localizado en las moléculas de la mezcla de reacción respondiendo a la conducción iónica y la rotación de dipolos e incrementando consecuentemente la velocidad de reacción y por lo tanto aumentando también su rendimiento [113].

El QUIN es un metabolito producido en la vía de la kinureninas que convierte el triptófano en el cofactor dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD⁺) y su administración intraestriatal en roedores constituye un modelo de excitotoxicidad ampliamente utilizado, ya que por tratarse de un agonista endógeno de los receptores NMDA, reproduce el efecto tóxico ampliamente caracterizado en diferentes padecimientos del sistema nervioso central en los que su nivel se encuentra elevado [26]. El incremento en los niveles de QUIN resulta en la activación excesiva de los receptores NMDA, provocando un aumento en la entrada neuronal de Ca²⁺, activando diferentes vías enzimáticas que incluyen a las de las proteincinasas, las fosfolipasas, las sintasas del óxido nítrico neuronal y proteasas

conduciendo a una respuesta apoptótica [114]. El QUIN genera también estrés oxidante ya que al interactuar con Fe^{2+} genera un complejo inductor de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno, incrementando la liberación de glutamato e inhibiendo su recaptura provocando daño oxidante a nivel de lípidos membranales y del ADN [115].

Los resultados obtenidos en la evaluación biológica realizada en este trabajo experimental demuestran neuroprotección significativa producida por algunos de los análogos de la dapsona sobre algunos parámetros de valoración del modelo de neuroexcitotoxicidad inducido por la inyección intraestriatal de QUIN. Sin embargo, entre las limitaciones de este estudio se encuentra incluida la imposibilidad de determinar si el efecto protector es atribuible a las moléculas evaluadas o a alguna especie derivada de su metabolismo por citocromos, ya que cualquier modificación estructural en la molécula original pudiera modificar las posibles interacciones a nivel de receptor, enzima o canal, el perfil farmacocinético y metabólico de la molécula y sus propiedades estructurales como agente antioxidante.

En este trabajo, los análogos Me-DDS, Et-DDS y Bu-DDS mostraron perfiles interesantes de protección al disminuir la conducta de giro provocada por el agonista dopaminérgico D2, clorhidrato de apomorfina y aumentar la conservación del contenido intraestriatal de GABA hasta niveles comparables a los de la DDS. Además dichos análogos disminuyeron su hematotoxicidad de manera significativa en comparación con la molécula original.

Aún cuando el análogo Pr-DDS y el intermediario de reacción ditosilado mostraron protección contra la conducta de giro, no lograron significancia estadística en cuanto a la preservación del contenido intraestriatal de GABA, aunque la tendencia hacia la conservación del aminoácido es notable, no afectando incluso la comprobación de la correlación estadística entre los datos experimentales obtenidos en el experimento de conducta de giro y en la determinación intraestriatal de GABA (Rho de Spearman = -0.487, $p < 0.01$). Sin embargo es necesario contemplar que el experimento de conducta de giro es susceptible a artefactos que pueden modificar los resultados de la prueba.

Aunque no haya podido registrarse mediante datos cromatográficos la presencia de los análogos Pr-DDS, Bu-DDS y del intermediario Tos-DDS en el líquido cefalorraquídeo a la media hora de su administración, tiempo elegido para reproducir las condiciones del experimento de conducta de giro, los datos de protección permiten deducir que las tres moléculas pudieron ejercer su efecto en el cuerpo estriado lesionado. La ausencia de señales en los cromatogramas podría deberse a las propiedades farmacocinéticas propias de cada molécula evaluada, ya que con el incremento en la longitud del sustituyente alifático de la molécula se presentan variaciones en el peso molecular, área superficial polar y coeficiente de partición octanol/agua (LogP). Sin embargo, esto no implica que después de 30 minutos en los que se llevó a cabo el muestreo, no se pudieran registrar concentraciones más altas en el líquido cefalorraquídeo e incluso no es posible descartar un fenómeno de flip-flop (donde $K_a \ll k_e$) de manera anterior a la realización del muestreo que permitiera alcanzar la concentración efectiva de las moléculas en el sitio de acción.

La capacidad de la DDS para atravesar la barrera hematoencefálica se encuentra ampliamente reportada en la literatura [66]. En este trabajo experimental, la presencia de DDS producida por el metabolismo de todos los análogos evaluados, incluyendo el intermediario ditosilado, demuestra la N-desalquilación oxidativa de dichas moléculas. Debido a esto, el efecto neuroprotector observado en la prueba de conducta de giro y en la determinación intraestriatal de GABA, podría ser debido a la suma de los efectos tanto del análogo como de la DDS generada por su metabolismo e incluso de alguna especie metabólica intermedia. Resalta el hecho de que el análogo Et-DDS, produce concentraciones hasta diez veces más grandes de DDS en plasma y líquido cefalorraquídeo con respecto a cualquiera de las demás moléculas evaluadas. Esto podría deberse a que la estructura del análogo Et-DDS le podría conferir propiedades para ser un mejor sustrato a nivel de citocromo P-450 para su N-desalquilación, ya que incluso los niveles de metahemoglobina producidos por la especies químicas oxidantes generadas durante su metabolismo (especies N-hidroxiladas) se ven elevados para este análogo entre las 8 y 16 horas en el perfil de porcentaje de metahemoglobina contra tiempo obtenido en la evaluación toxicológica.

En la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas para el tratamiento de padecimientos neurológicos agudos y neurodegenerativos con alta prevalencia a nivel mundial (infarto cerebral, trauma, epilepsia, enfermedad de Huntington, Alzheimer, etc) cuya etiología está relacionada con la excitotoxicidad inducida por la activación de los receptores NMDA, los efectos anticonvulsivantes y neuroprotectores mostrados por la DDS y algunos de sus análogos en varios modelos experimentales relacionados a la excitotoxicidad han llevado a algunos grupos de investigación a proponer que moléculas que poseen una estructura diaminodifenilo, podrían modular la activación de los receptores NMDA [2, 116, 117]. Sin embargo, estudios de unión (binding) realizados por Bence et al., (2000), evidenciaron, que en el caso de la DDS, ésta no interactúa directamente con los sitios de poliaminas y del antagonista MK-801, identificando ciertas características estructurales de entre las cuales se corrobora que la presencia de dos anillos aromáticos unidos por un grupo funcional electronegativo en algunos de los análogos evaluados es necesaria para el desplazamiento de la espermidina y la dizolcipina de sus sitios en el receptor NMDA para lograr su modulación. Bence et al., señalan también la posibilidad de que un metabolito desconocido de la molécula original (DDS) pudiera ser el responsable por la protección contra el daño producido por la activación del receptor NMDA [118].

Entre los mecanismos de acción discutidos previamente en la literatura, por los cuales la DDS o alguno de sus análogos pudieran tener su efecto neuroprotector están incluidos: el aumento en la inhibición neuronal mediada por células gabaérgicas, la capacidad de evitar directa o indirectamente la entrada de calcio de una manera similar a la zonisamida y la protección contra el daño generado por las características asociadas a los procesos inflamatorios asociados a modelos experimentales de excitotoxicidad, como la inhibición de algunas funciones dependientes de calcio, incluyendo la liberación de proteasas y de especies oxidantes (e.g. peróxido de hidrógeno y ácido hipocloroso) [119-123].

Recientemente se ha propuesto que la dapsona puede ejercer un bloqueo en los canales de sodio encargados de amplificar la cascada excitotóxica (AMPA y kainato) mediante un mecanismo análogo al inhibidor BW1003C87, el cual tiene la capacidad de inhibir la

liberación de glutamato y bloquear las corrientes de sodio y para el cual se reporta efectividad en modelos de edema traumático cerebral [124].

Las propiedades antioxidantes de la DDS están bien documentadas, en estudios previos por Rodríguez et al., (1999), quienes reportaron una disminución en la peroxidación de lípidos en ratas pretratadas con DDS a una dosis de 12.5 mg/kg en el modelo de excitotoxicidad generada por la administración intraestriatal de ácido quinolínico, al comparar contra el grupo control de daño [80]. Existen más reportes sobre las propiedades antioxidantes de esta sulfona debido a su actividad como atrapador de especies reactivas de oxígeno y por su influencia en los sistemas citotóxicos de las enzimas, peroxidasa y mieloperoxidasa. Sin embargo, la actividad de los análogos sobre marcadores de daño oxidante e inflamatorio permanecen por ser determinados en el modelo experimental utilizado en este trabajo [125, 126].

De manera similar a lo reportado por Coleman et al., [127], quienes encontraron una significativa reducción de hasta el 75% en la producción de metahemoglobina por el análogo Me-DDS en experimentos *in vitro*, incubando dicha molécula con eritrocitos en preparaciones microsomales, todos los análogos evaluados disminuyeron la producción de metahemoglobina entre 31% para el análogo Me-DDS y 72% para el intermediario Tos-DDS.

La presencia de sustituyentes alquilo en los grupos aminos de la DDS no impiden la N-oxidación metabólica de aminas aromáticas realizada a nivel hepático por el citocromo P-450 y la flavinmono-oxigenasa y de manera periférica por la sintetasa de la prostaglandina H y la mieloperoxidasa. Sin embargo, la formación de N-hidroxilaminas se ve disminuida ya que la velocidad de N-desalquilación se ve reducida mientras más grande es la cadena alifática del sustituyente en los grupos amino, aumentando además el número de especies metabólicas formadas y generando incluso intermediarios poco estables como las carbinolaminas en detrimento de la formación de metabolitos con capacidad para oxidar la hemoglobina [128, 129].

La capacidad neuroprotectora y la disminución en la formación de metahemoglobina demostrada por algunos de los análogos en este trabajo de tesis los hacen candidatos a una mejor caracterización de su efectividad farmacológica. De manera prospectiva se propone la evaluación del efecto protector sobre características de daño relacionado a la formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en el modelo experimental utilizado en nuestro trabajo, mediante la determinación de nitritos y nitratos, de la expresión específica de la sintasa del óxido nítrico constitutiva (neuronal) y de la protección contra la peroxidación de lípidos. También es necesaria la exploración del posible efecto protector de los análogos sobre características relacionadas a la inflamación inducida por el ácido quinolínico y por supuesto, la realización de un estudio farmacocinético y metabólico de aquellas moléculas que demuestren un mejor perfil protector.

8. CONCLUSIONES

- a) La ruta de síntesis planteada permite la obtención satisfactoria de los análogos propuestos. La estructura de todos los intermediarios de reacción y productos fue confirmada mediante las asignaciones espectroscópicas de RMN de ^1H y ^{13}C .
- b) El uso de un sistema de microondas en la segunda etapa de nuestra ruta de síntesis (reacción de sustitución nucleofílica bimolecular), para añadir simétricamente el sustituyente alquilo deseado, es novedoso, reduce el tiempo de reacción y aumenta el rendimiento global de los productos de la síntesis.
- c) Los análogos N,N'-dimetilado, N,N'-dietilado y N,N'-dibutilado demostraron efecto neuroprotector significativo contra la excitotoxicidad producida por la inyección intraestriatal de ácido quinolínico.
- d) Todos los análogos propuestos disminuyeron la formación de metahemoglobina, por lo que la N-alquilación de los grupos amino de la DDS, inhibe de manera significativa la formación de metahemoglobina generada por metabolitos oxidantes productos de la N-desalquilación y N-oxidación *in vivo*.
- e) Los análogos N,N'-dimetilado y N,N'-dietilado mostraron los mejores cocientes de seguridad (efecto/toxicidad), por lo que son candidatos a una mayor caracterización de los mecanismos farmacológicos por los cuales pudieran ejercer su efecto neuroprotector.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Chen, C.-J., Liao, S.-L., y Kuo, J.-S., *Gliotoxic Action of Glutamate on Cultured Astrocytes*. Journal of neurochemistry, 2000. **75**(4): p. 1557-1565.
2. Mehta, S.L., Manhas, N., y Raghbir, R., *Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics*. Brain research reviews, 2007. **54**(1): p. 34-66.
3. Mehta, A., Prabhakar, M., Kumar, P., Deshmukh, R., y Sharma, P.L., *Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders*. European Journal of pharmacology, 2013. **698**(1-3): p. 6-18.
4. Tapiero, H., Mathé, G., Couvreur, P., y Tew, K.D., *II. Glutamine and glutamate*. Biomedicine & pharmacotherapy, 2002. **56**(9): p. 446-457.
5. Bradley, S.J. y Challiss, R.A.J., *G protein-coupled receptor signalling in astrocytes in health and disease: A focus on metabotropic glutamate receptors*. Biochemical pharmacology, 2012. **84**(3): p. 249-259.
6. Salinska E Fau - Danysz, W., Danysz W Fau - Lazarewicz, J.W., y Lazarewicz, J.W., *The role of excitotoxicity in neurodegeneration*. Folia neuropathologica, 2005. **43**(4): p. 322-39.
7. Wang Sj Fau - Yang, T.-T. y Yang, T.T., *Role of central glutamatergic neurotransmission in the pathogenesis of psychiatric and behavioral disorders*. Drug news and perspectives, 2005. **18**(9): p. 561-6.
8. Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., y Traynelis, S.F., *The Glutamate Receptor Ion Channels*. Pharmacological reviews, 1999. **51**(1): p. 7-62.
9. Watkins, J.C. y Jane, D.E., *The glutamate story*. British Journal of Pharmacology, 2006. **147**(S1): p. S100-S108.
10. Mayer, M.L. y Westbrook, G.L., *Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones*. The Journal of physiology, 1987. **394**(1): p. 501-527.
11. Paoletti, P. y Neyton, J., *NMDA receptor subunits: function and pharmacology*. Current opinion in pharmacology, 2007. **7**(1): p. 39-47.
12. Mayer, M.L., *Glutamate receptors at atomic resolution*. Nature, 2006. **440**(7083): p. 456-462.
13. Herin, G.A. y Aizenman, E., *Amino terminal domain regulation of NMDA receptor function*. European journal of pharmacology, 2004. **500**(1-3): p. 101-111.

14. Yamakura, T. y Shimoji, K., *Subunit- and site-specific pharmacology of the NMDA receptor channel*. Progress in neurobiology, 1999. **59**(3): p. 279-298.
15. Olney, J.W. y de Gubareff, T., *Glutamate neurotoxicity and Huntington's chorea*. Nature, 1978. **271**(5645): p. 557-9.
16. Sattler, R. y Tymianski, M., *Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death*. Molecular neurobiology, 2001. **24**(1-3): p. 107-129.
17. Wang, Y. y Qin, Z.-h., *Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death*. Apoptosis, 2010. **15**(11): p. 1382-1402.
18. Maragakis, N.J. y Rothstein, J.D., *Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease*. Nature clinical practice neurology, 2006. **2**(12): p. 679-689.
19. Al-Noori, S. y Swann, J.W., *A role for sodium and chloride in kainic acid-induced beading of inhibitory interneuron dendrites*. Neuroscience, 2000. **101**(2): p. 337-348.
20. Mehta, A., Prabhakar, M., Kumar, P., Deshmukh, R., y Sharma, P.L., *Excitotoxicity: Bridge to various triggers in neurodegenerative disorders*. European journal of pharmacology, (0).
21. Farooqui, A.A. y Horrocks, L.A., *Excitotoxicity and Neurological Disorders: Involvement of Membrane Phospholipids*, in *International review of neurobiology*, J.B. Ronald and R.A. Harris, Editors. 1994, Academic Press. p. 267-323.
22. Farooqui, A.A. y Horrocks, L.A., *Involvement of glutamate receptors, lipases, and phospholipases in long-term potentiation and neurodegeneration*. Journal of neuroscience Research, 1994. **38**(1): p. 6-11.
23. Matute, C., Domercq, M., y Sánchez-Gómez, M.-V., *Glutamate-mediated glial injury: Mechanisms and clinical importance*. Glia, 2006. **53**(2): p. 212-224.
24. Redmond, J.M., Gillinov, A.M., Zehr, K.J., Blue, M.E., Troncoso, J.C., Reitz, B.A., Cameron, D.E., Johnston, M.V., y Baumgartner, W.A., *Glutamate excitotoxicity: a mechanism of neurologic injury associated with hypothermic circulatory arrest*. The journal of thoracic and cardiovascular surgery, 1994. **107**(3): p. 776-86; discussion 786-7.
25. Stone, T.W. y Perkins, M.N., *Quinolinic acid: a potent endogenous excitant at amino acid receptors in CNS*. European journal of pharmacology, 1981. **72**(4): p. 411-2.

26. Stone, T.W., *Kynurenines in the CNS: from endogenous obscurity to therapeutic importance*. Progress in neurobiology, 2001. **64**(2): p. 185-218.
27. Foster, A.C., White, R.J., y Schwarcz, R., *Synthesis of quinolinic acid by 3-hydroxyanthranilic acid oxygenase in rat brain tissue in vitro*. Journal of neurochemistry, 1986. **47**(1): p. 23-30.
28. Wolfensberger, M., Amsler, U., Cuenod, M., Foster, A.C., Whetsell, W.O., Jr., y Schwarcz, R., *Identification of quinolinic acid in rat and human brain tissue*. Neuroscience letters, 1983. **41**(3): p. 247-52.
29. Stone, T.W., *Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids*. Pharmacological reviews, 1993. **45**(3): p. 309-79.
30. Magni, G., Orsomando, G., Raffelli, N., y Ruggieri, S., *Enzymology of mammalian NAD metabolism in health and disease*. Frontiers in bioscience : a journal and virtual library, 2008. **13**: p. 6135-54.
31. Sinz, E.H., Kochanek, P.M., Heyes, M.P., Wisniewski, S.R., Bell, M.J., Clark, R.S., DeKosky, S.T., Blight, A.R., y Marion, D.W., *Quinolinic acid is increased in CSF and associated with mortality after traumatic brain injury in humans*. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 1998. **18**(6): p. 610-5.
32. Heyes, M.P., *Quinolinic acid and inflammation*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1993. **679**: p. 211-6.
33. Stone, T.W., *Endogenous neurotoxins from tryptophan*. Toxicol: official journal of the International Society on Toxinology, 2001. **39**(1): p. 61-73.
34. Schwarcz, R. y Kohler, C., *Differential vulnerability of central neurons of the rat to quinolinic acid*. Neuroscience letters, 1983. **38**(1): p. 85-90.
35. Beal, M.F., Kowall, N.W., Ellison, D.W., Mazurek, M.F., Swartz, K.J., y Martin, J.B., *Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid*. Nature, 1986. **321**(6066): p. 168-71.
36. de Carvalho, L.P., Bochet, P., y Rossier, J., *The endogenous agonist quinolinic acid and the non endogenous homoquinolinic acid discriminate between NMDAR2 receptor subunits*. Neurochemistry international, 1996. **28**(4): p. 445-52.
37. Foster, A.C., Collins, J.F., y Schwarcz, R., *On the excitotoxic properties of quinolinic acid, 2,3-piperidine dicarboxylic acids and structurally related compounds*. Neuropharmacology, 1983. **22**(12A): p. 1331-42.

38. Giordano, M., Ford, L.M., Brauckmann, J.L., Norman, A.B., y Sanberg, P.R., *MK801 prevents quinolinic acid-induced behavioral deficits and neurotoxicity in the striatum*. Brain research bulletin, 1990. **24**(3): p. 313-319.
39. Kohler, C., Eriksson, L.G., Okuno, E., y Schwarcz, R., *Localization of quinolinic acid metabolizing enzymes in the rat brain. Immunohistochemical studies using antibodies to 3-hydroxyanthranilic acid oxygenase and quinolinic acid phosphoribosyltransferase*. Neuroscience, 1988. **27**(1): p. 49-76.
40. Bordelon, Y.M., Chesselet, M.F., Nelson, D., Welsh, F., y Erecinska, M., *Energetic dysfunction in quinolinic acid-lesioned rat striatum*. Journal of neurochemistry, 1997. **69**(4): p. 1629-39.
41. Sas, K., Robotka, H., Toldi, J., y Vécsei, L., *Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders*. Journal of the neurological sciences, 2007. **257**(1-2): p. 221-239.
42. Kerr, S.J., Armati, P.J., y Brew, B.J., *Neurocytotoxicity of quinolinic acid in human brain cultures*. Journal of neurovirology, 1995. **1**(5-6): p. 375-80.
43. Chiarugi, A., Meli, E., y Moroni, F., *Similarities and differences in the neuronal death processes activated by 3OH-kynurenine and quinolinic acid*. Journal of neurochemistry, 2001. **77**(5): p. 1310-8.
44. Whetsell, W.O., Jr. y Schwarcz, R., *Prolonged exposure to submicromolar concentrations of quinolinic acid causes excitotoxic damage in organotypic cultures of rat corticostriatal system*. Neuroscience letters, 1989. **97**(3): p. 271-5.
45. Speciale, C. y Schwarcz, R., *On the production and disposition of quinolinic acid in rat brain and liver slices*. Journal of neurochemistry, 1993. **60**(1): p. 212-8.
46. Foster, A.C., Miller, L.P., Oldendorf, W.H., y Schwarcz, R., *Studies on the disposition of quinolinic acid after intracerebral or systemic administration in the rat*. Experimental neurology, 1984. **84**(2): p. 428-40.
47. Rios, C. y Santamaria, A., *Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates*. Neurochemical research, 1991. **16**(10): p. 1139-43.
48. Santamaria, A. y Rios, C., *MK-801, an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, blocks quinolinic acid-induced lipid peroxidation in rat corpus striatum*. Neuroscience letters, 1993. **159**(1-2): p. 51-4.
49. Rodriguez-Martinez, E., Camacho, A., Maldonado, P.D., Pedraza-Chaverri, J., Santamaria, D., Galvan-Arzate, S., y Santamaria, A., *Effect of quinolinic acid on endogenous antioxidants in rat corpus striatum*. Brain research, 2000. **858**(2): p. 436-9.

50. Leipnitz, G., Schumacher, C., Scussiato, K., Dalcin, K.B., Wannmacher, C.M., Wyse, A.T., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M., y Latini, A., *Quinolinic acid reduces the antioxidant defenses in cerebral cortex of young rats*. International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience, 2005. **23**(8): p. 695-701.
51. Stipek, S., Stastny, F., Platenik, J., Crkovska, J., y Zima, T., *The effect of quinolinate on rat brain lipid peroxidation is dependent on iron*. Neurochemistry international, 1997. **30**(2): p. 233-7.
52. Coleman, M.D., *Dapsone: modes of action, toxicity and possible strategies for increasing patient tolerance*. The British journal of dermatology, 1993. **129**(5): p. 507-13.
53. Warren, E., George, S., You, J., y Kazanjian, P., *Advances in the treatment and prophylaxis of Pneumocystis carinii pneumonia*. Pharmacotherapy, 1997. **17**(5): p. 900-16.
54. Kemper, C.A., Tucker, R.M., Lang, O.S., Kessinger, J.M., Greene, S.I., Deresinski, S.C., y Stevens, D.A., *Low-dose dapsone prophylaxis of Pneumocystis carinii pneumonia in AIDS and AIDS-related complex*. AIDS, 1990. **4**(11): p. 1145-8.
55. Torres, R.A., Barr, M., Thorn, M., Gregory, G., Kiely, S., Chanin, E., Carlo, C., Martin, M., y Thornton, J., *Randomized trial of dapsone and aerosolized pentamidine for the prophylaxis of Pneumocystis carinii pneumonia and toxoplasmic encephalitis*. The American journal of medicine, 1993. **95**(6): p. 573-83.
56. Gallant, J.E., Moore, R.D., y Chaisson, R.E., *Prophylaxis for opportunistic infections in patients with HIV infection*. Annals of internal medicine, 1994. **120**(11): p. 932-44.
57. Wolf, R. y Orni-Wasserlauf, R., *A century of the synthesis of dapsone: its anti-infective capacity now and then*. International journal of dermatology, 2000. **39**(10): p. 779-783.
58. Zhu, Y.I. y Stiller, M.J., *Dapsone and sulfones in dermatology: overview and update*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2001. **45**(3): p. 420-34.
59. Wolf, R., Matz, H., Orion, E., Tuzun, B., y Tuzun, Y., *Dapsone*. Dermatology online journal, 2002. **8**(1): p. 2.
60. Bozeman, P.M., Learn, D.B., y Thomas, E.L., *Inhibition of the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase by dapsone*. Biochemical pharmacology, 1992. **44**(3): p. 553-63.

61. Suda, T., Suzuki, Y., Matsui, T., Inoue, T., Niide, O., Yoshimaru, T., Suzuki, H., Ra, C., y Ochiai, T., *Dapsone suppresses human neutrophil superoxide production and elastase release in a calcium-dependent manner*. The British journal of dermatology, 2005. **152**(5): p. 887-95.
62. Kettle, A.J., Gedye, C.A., y Winterbourn, C.C., *Superoxide is an antagonist of antiinflammatory drugs that inhibit hypochlorous acid production by myeloperoxidase*. Biochemical pharmacology, 1993. **45**(10): p. 2003-10.
63. Debol, S.M., Herron, M.J., y Nelson, R.D., *Anti-inflammatory action of dapsone: inhibition of neutrophil adherence is associated with inhibition of chemoattractant-induced signal transduction*. Journal of leukocyte biology, 1997. **62**(6): p. 827-36.
64. Pieters, F.A. y Zuidema, J., *The absolute oral bioavailability of dapsone in dogs and humans*. International journal of clinical pharmacology, therapy, and toxicology, 1987. **25**(7): p. 396-400.
65. Pieters, F.A. y Zuidema, J., *The pharmacokinetics of dapsone after oral administration to healthy volunteers*. British journal of clinical pharmacology, 1986. **22**(4): p. 491-4.
66. Gatti, G., Hossein, J., Malena, M., Cruciani, M., y Bassetti, M., *Penetration of dapsone into cerebrospinal fluid of patients with AIDS*. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 1997. **40**(1): p. 113-5.
67. Edstein, M.D., Veenendaal, J.R., Newman, K., y Hyslop, R., *Excretion of chloroquine, dapsone and pyrimethamine in human milk*. British journal of clinical pharmacology, 1986. **22**(6): p. 733-5.
68. Zuidema, J., Hilbers-Modderman, E.S., y Merkus, F.W., *Clinical pharmacokinetics of dapsone*. Clinical pharmacokinetics, 1986. **11**(4): p. 299-315.
69. Gill, H.J., Tingle, M.D., y Park, B.K., *N-Hydroxylation of dapsone by multiple enzymes of cytochrome P450: implications for inhibition of haemotoxicity*. British journal of clinical pharmacology, 1995. **40**(6): p. 531-8.
70. Vage, C. y Svensson, C.K., *Evidence that the biotransformation of dapsone and monoacetyldapsone to their respective hydroxylamine metabolites in rat liver microsomes is mediated by cytochrome P450 2C6/2C11 and 3A1*. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals, 1994. **22**(4): p. 572-7.
71. Hutzler, J.M., Wienkers, L.C., Wahlstrom, J.L., Carlson, T.J., y Tracy, T.S., *Activation of cytochrome P450 2C9-mediated metabolism: mechanistic evidence in support of kinetic observations*. Archives of biochemistry and biophysics, 2003. **410**(1): p. 16-24.

72. Winter, H.R., Wang, Y., y Unadkat, J.D., *CYP2C8/9 mediate dapsone N-hydroxylation at clinical concentrations of dapsone*. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals, 2000. **28**(8): p. 865-8.
73. Ellard, G.A., *Absorption, metabolism and excretion of di(rho-aminophenyl) sulphone (dapsone) and di(rho-aminophenyl) sulphoxide in man*. British journal of pharmacology and chemotherapy, 1966. **26**(1): p. 212-7.
74. Hamada, K., Hiyoshi, T., Kobayashi, S., Ishida, S., Yagi, K., y Seino, M., *Anticonvulsive effect of dapsone (4,4'-diaminodiphenyl sulfone) on amygdala-kindled seizures in rats and cats*. Epilepsy research, 1991. **10**(2-3): p. 93-102.
75. Ishida, S., Hamada, K., Yagi, K., y Seino, M., *Comparing the anticonvulsive effects of dapsone on amygdala-kindled seizures and hippocampal-kindled seizures in rats*. Acta neurologica Scandinavica, 1992. **85**(2): p. 132-5.
76. Rios, C., Altagracia, M., Kravzov, J., Monroy-Noyola, A., Alvarado-Calvillo, R., Manjarrez-Marmolejo, J., y Osorio-Rico, L., *EEG evaluation of the anticonvulsive effect of dapsone in the kainic acid model of epilepsy*. Proceedings of the Western Pharmacology Society, 1993. **36**: p. 259-61.
77. Altagracia, M., Monroy-Noyola, A., Osorio-Rico, L., Kravzov, J., Alvarado-Calvillo, R., Manjarrez-Marmolejo, J., y Rios, C., *Dapsone attenuates kainic acid-induced seizures in rats*. Neuroscience letters, 1994. **176**(1): p. 52-4.
78. Altagracia, M., Kravzov, J., Santamaria, A., Rios, C., Ordaz, H., y Gonzalez, L., *Dapsone administration prevents quinolinate-induced neurotoxicity in rats*. Proceedings of the Western Pharmacology Society, 1994. **37**: p. 63.
79. Santamaria, A., Ordaz-Moreno, J., Rubio-Osornio, M., Solis-Hernandez, F., y Rios, C., *Neuroprotective effect of dapsone against quinolinate- and kainate-induced striatal neurotoxicities in rats*. Pharmacology & toxicology, 1997. **81**(6): p. 271-5.
80. Rodriguez, E., Mendez-Armenta, M., Villeda-Hernandez, J., Galvan-Arzate, S., Barroso-Moguel, R., Rodriguez, F., Rios, C., y Santamaria, A., *Dapsone prevents morphological lesions and lipid peroxidation induced by quinolinic acid in rat corpus striatum*. Toxicology, 1999. **139**(1-2): p. 111-8.
81. Fredenberg, M.F. y Malkinson, F.D., *Sulfone therapy in the treatment of leukocytoclastic vasculitis. Report of three cases*. Journal of the American Academy of Dermatology, 1987. **16**(4): p. 772-8.
82. Wozel, G. y Barth, J., *Current aspects of modes of action of dapsone*. International journal of dermatology, 1988. **27**(8): p. 547-52.
83. Lopez-Naranjo, F., Castaneda-Lopez, C., Rojas-Oviedo, I., Altagracia-Martinez, M., Krazov-Jinich, J., Manjarrez-Marmolejo, J., y Alvarado-Calvillo, R.,

- Anticonvulsant activity of dapsone analogs. Electrophysiologic evaluation.* Archives of medical research, 2003. **34**(4): p. 269-72.
84. Altagracia, M., Rojas-Oviedo, I., Kravzov, J., Lopez-Naranjo, F., y Rios, C., *Síntesis de nuevos derivados de dapsona con posible acción antiepiléptica.* Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 1998. **29**: p. 25-27.
 85. Kravzov, J., Cahero, G., Altagracia, M., y Rios, C., *Derivados de dapsona con actividad anticonvulsiva.* Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 1996. **26**(5-6): p. 14-17.
 86. Tingle, M.D., Mahmud, R., Maggs, J.L., Pirmohamed, M., y Park, B.K., *Comparison of the metabolism and toxicity of dapsone in rat, mouse and man.* The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 1997. **283**(2): p. 817-23.
 87. Uehleke, H. y Tabarelli, S., *N-hydroxylation of 4,4'-diaminodiphenylsulphone (Dapsone) by liver microsomes, and in dogs and humans.* Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology, 1973. **278**(1): p. 55-68.
 88. Uetrecht, J., Zahid, N., Shear, N.H., y Biggar, W.D., *Metabolism of dapsone to a hydroxylamine by human neutrophils and mononuclear cells.* The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 1988. **245**(1): p. 274-9.
 89. Grossman, S.J. y Jollow, D.J., *Role of dapsone hydroxylamine in dapsone-induced hemolytic anemia.* The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 1988. **244**(1): p. 118-25.
 90. McMillan, D.C., Jensen, C.B., y Jollow, D.J., *Role of lipid peroxidation in dapsone-induced hemolytic anemia.* The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 1998. **287**(3): p. 868-76.
 91. Jollow, D.J., Bradshaw, T.P., y McMillan, D.C., *Dapsone-induced hemolytic anemia.* Drug metabolism reviews, 1995. **27**(1-2): p. 107-24.
 92. McMillan, D.C., Simson, J.V., Budinsky, R.A., y Jollow, D.J., *Dapsone-induced hemolytic anemia: effect of dapsone hydroxylamine on sulfhydryl status, membrane skeletal proteins and morphology of human and rat erythrocytes.* The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 1995. **274**(1): p. 540-7.
 93. Coleman, M.D., *Dapsone toxicity: some current perspectives.* General pharmacology, 1995. **26**(7): p. 1461-7.
 94. Bradberry, S., *Methaemoglobinaemia.* Medicine, 2007. **35**(10): p. 552-553.
 95. Prussick, R., Ali, M.A., Rosenthal, D., y Guyatt, G., *The protective effect of vitamin E on the hemolysis associated with dapsone treatment in patients with dermatitis herpetiformis.* Archives of dermatology, 1992. **128**(2): p. 210-3.

96. Coleman, M.D., Rhodes, L.E., Scott, A.K., Verbov, J.L., Friedmann, P.S., Breckenridge, A.M., y Park, B.K., *The use of cimetidine to reduce dapsone-dependent methaemoglobinaemia in dermatitis herpetiformis patients*. British journal of clinical pharmacology, 1992. **34**(3): p. 244-9.
97. Coleman, M.D., *Dapsone-mediated agranulocytosis: risks, possible mechanisms and prevention*. Toxicology, 2001. **162**(1): p. 53-60.
98. Waldinger, T.P., Siegle, R.J., Weber, W., y Voorhees, J.J., *Dapsone-induced peripheral neuropathy. Case report and review*. Archives of dermatology, 1984. **120**(3): p. 356-9.
99. Lawrence, W.A., Olsen, H.W., y Nickles, D.J., *Dapsone hepatitis*. Archives of internal medicine, 1987. **147**(1): p. 175.
100. Prussick, R. y Shear, N.H., *Dapsone hypersensitivity syndrome*. Journal of the American Academy of Dermatology, 1996. **35**(2 Pt 2): p. 346-9.
101. Coleman, M.D., Hadley, S., Perris, A.D., Jorga, K., y Seydel, J.K., *Studies on the toxicity and efficacy of some ester analogues of dapsone in vitro using rat and human tissues*. Environmental toxicology and pharmacology, 2002. **12**(1): p. 7-13.
102. Coleman, M.D., Smith, S.N., Kelly, D.E., Kelly, S.L., y Seydel, J.K., *Studies on the toxicity of analogues of dapsone in-vitro using rat, human and heterologously expressed metabolizing systems*. The Journal of pharmacy and pharmacology, 1996. **48**(9): p. 945-50.
103. Coleman, M.D., Tingle, M.D., Hussain, F., Storr, R.C., y Park, B.K., *An investigation into the haematological toxicity of structural analogues of dapsone in-vivo and in-vitro*. The Journal of pharmacy and pharmacology, 1991. **43**(11): p. 779-84.
104. Ren, B.Q., Xiang, X.G., y Chen, Z.D., *Species identification of Alnus (Betulaceae) using nrDNA and cpDNA genetic markers*. Molecular ecology resources, 2010. **10**(4): p. 594-605.
105. Pieper H Fau - Seydel, J.K., Seydel Jk Fau - Kruger, G., Kruger G Fau - Noll, K., Noll K Fau - Keck, J., Keck J Fau - Wiese, M., y Wiese, M., *Preparation and biological activity of new substituted antimalarial*. Arzneimittelforschung, 1989. **39**(9): p. 1073-80.
106. Pérez-Neri, I., Castro, E., Montes, S., Boll, M.-C., Barges-Coll, J., Soto-Hernández, J.L., y Ríos, C., *Arginine, citrulline and nitrate concentrations in the cerebrospinal fluid from patients with acute hydrocephalus*. Journal of Chromatography B, 2007. **851**(1-2): p. 250-256.

107. Nirogi, R., Kandikere, V., Mudigonda, K., Bhyrapuneni, G., Muddana, N., Saralaya, R., y Benade, V., *A simple and rapid method to collect the cerebrospinal fluid of rats and its application for the assessment of drug penetration into the central nervous system*. Journal of neuroscience methods, 2009. **178**(1): p. 116-119.
108. Evelyn, K.A. y Malloy, H.T., *Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin, and sulfhemoglobin in a simple sample of blood*. Journal of biological chemistry, 1938. **126**(2): p. 655-662.
109. Bickel, U., *How to measure drug transport across the blood-brain barrier*. NeuroRx: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics, 2005. **2**(1): p. 15-26.
110. Masuko, T., Namiki, R., Nemoto, Y., Miyake, M., Kizawa, Y., Suzuki, T., Kashiwagi, K., Igarashi, K., y Kusama, T., *Neuroprotection by Tosyl-Polyamine Derivatives through the Inhibition of Ionotropic Glutamate Receptors*. Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 2009. **331**(2): p. 522-530.
111. Salvatore, R.N., Yoon, C.H., y Jung, K.W., *Synthesis of secondary amines*. Tetrahedron, 2001. **57**(37): p. 7785-7811.
112. Pieper, H., Seydel, J.K., Kruger, G., Noll, K., Keck, J., y Wiese, M., *Preparation and biological activity of new substituted antimalarial diaminodiphenylsulfones*. Arzneimittelforschung, 1989. **39**(9): p. 1073-80.
113. Santagada, V., Frecentese, F., Perissutti, E., Fiorino, F., Severino, B., y Caliendo, G., *Microwave assisted synthesis: a new technology in drug discovery*. Mini-Reviews in medicinal chemistry, 2009. **9**(3): p. 340-58.
114. Guillemin, G.J., *Quinolinic acid, the inescapable neurotoxin*. FEBS Journal, 2012. **279**(8): p. 1356-1365.
115. Cruz, V.P.-D.L., Carrillo-Mora, P., y Santamaría, A., *Quinolinic Acid, an Endogenous Molecule Combining Excitotoxicity, Oxidative Stress and Other Toxic Mechanisms*. International journal of tryptophan research, 2012. **5**(3068-IJTR-Quinolinic-Acid,-an-Endogenous-Molecule-Combining-Excitotoxicity,-Oxid.pdf): p. 1-8.
116. Worthen, D.R., Bence, A.K., Stables, J.P., y Crooks, P.A., *In vivo evaluation of diaminodiphenyls: anticonvulsant agents with minimal acute neurotoxicity*. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2009. **19**(17): p. 5012-5.
117. Barrios, I.A., Bruno-Blanch, L.E., y Estiú, G.L., *Pharmacophoric pattern of anti-epileptic sulfonamides and sulfamates. Theoretical study of the associated requirements*. Journal of molecular structure: THEOCHEM, 2002. **580**(1-3): p. 243-250.

118. Bence, A.K., Rogers, D.T., Worthen, D.R., Fu, M., Littleton, J.M., y Crooks, P.A., *Dapsone analogs as potential polyamine binding site modulators of the N-methyl-D-aspartate receptor complex*. Drug development research, 2000. **51**(4): p. 268-72.
119. Debol, S.M., Herron, M.J., y Nelson, R.D., *Anti-inflammatory action of dapsone: inhibition of neutrophil adherence is associated with inhibition of chemoattractant-induced signal transduction*. Journal of leukocyte biology, 1997. **62**(6): p. 827-36.
120. Suda, T., Suzuki, Y., Matsui, T., Inoue, T., Niide, O., Yoshimaru, T., Suzuki, H., Ra, C., y Ochiai, T., *Dapsone suppresses human neutrophil superoxide production and elastase release in a calcium-dependent manner*. British journal dermatology, 2005. **152**(5): p. 887-95.
121. Nader-Kawachi, J., Góngora-Rivera, F., Santos-Zambrano, J., Calzada, P., y Ríos, C., *Neuroprotective effect of dapsone in patients with acute ischemic stroke: a pilot study*. Neurology research, 2007. **29**: p. 331-4.
122. Rios, C., Altagracia, M., Kravzov, J., Monroy-Noyola, A., Alvarado-Calvillo, R., Manjarrez-Marmolejo, J., y Osorio-Rico, L., *EEG evaluation of the anticonvulsive effect of dapsone in the kainic acid model of epilepsy*. Proceedings of the West Pharmacology Society, 1993. **36**: p. 259-61.
123. Rios, C., Nader-Kawachi, J., Rodriguez-Payan, A.J., y Nava-Ruiz, C., *Neuroprotective effect of dapsone in an occlusive model of focal ischemia in rats*. Brain research 2004. **999**(2): p. 212-5.
124. Okiyama, K., Smith, D.H., Gennarelli, T.A., Simon, R.P., Leach, M., y McIntosh, T.K., *The sodium channel blocker and glutamate release inhibitor BW1003C87 and magnesium attenuate regional cerebral edema following experimental brain injury in the rat*. Journal of neurochemistry, 1995. **64**(2): p. 802-9.
125. Fredenberg, M.F. y Malkinson, F.D., *Sulfone therapy in the treatment of leukocytoclastic vasculitis. Report of three cases*. Journal of the American Academy of Dermatology, 1987. **16**(4): p. 772-8.
126. Wozel, G. y Lehmann, B., *Dapsone inhibits the generation of 5-lipoxygenase products in human polymorphonuclear leukocytes*. Skin pharmacology, 1995. **8**(4): p. 196-202.
127. Coleman, M.D., Smith, S.N., Kelly, D.E., Kelly, S.L., y Seydel, J.K., *Studies on the Toxicity of Analogues of Dapsone In-vitro Using Rat, Human and Heterologously Expressed Metabolizing Systems†*. Journal of pharmacy and pharmacology, 1996. **48**(9): p. 945-950.
128. Guengerich, F.P., Okazaki, O., Seto, Y., y Macdonald, T.L., *Radical cation intermediates in N-dealkylation reactions*. Xenobiotica, 1995. **25**(7): p. 689-709.

129. Meunier, B., de Visser, S.P., y Shaik, S., *Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome p450 enzymes*. Chemical reviews, 2004. **104**(9): p. 3947-80.

10. APÉNDICE

10.1. Publicación



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Neuroscience Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neulet

Protective effect of *N,N'*-dialkylated analogs of 4,4'-diaminodiphenylsulfone in a model of intrastriatal quinolinic acid induced-excitotoxicity

Luis Tristán-López^{a,b}, Víctor Pérez-Álvarez^b, Francisca Pérez-Severiano^a, Sergio Montes^a, Iván Pérez-Neri^a, Liliana Rivera-Espinosa^c, Camilo Ríos^{a,*}

^a Neurochemistry Department, National Institute of Neurology and Neurosurgery "Manuel Velasco Suárez", Av. Insurgentes Sur # 3877, Col. La Fama, Del. Tlalpan, Mexico City, C.P. 14209, Mexico

^b Pharmacology Department, Center of Research and Advanced Studies of the Polytechnic National Institute (Cinvestav-Zacatenco), Av. Instituto Politécnico Nacional # 2508, Col. San Pedro Zacatenco, Del. Gustavo A. Madero, Mexico City, C.P. 07300, Mexico

^c Pharmacology Department, National Institute of Pediatrics, Av. Insurgentes Sur # 3700, Col. Insurgentes Cuicuilco, Del. Coyoacán, Mexico City, C.P. 04530, Mexico

HIGHLIGHTS

- We compared the neuroprotective effect of 5 *N,N'*-dialkylated analogs of dapsone.
- Effect of molecules was assessed in quinolinic acid intrastriatal administration model.
- All analogs showed protection against circling behavior induced by apomorphine.
- Three analogs prevented intrastriatal GABA decrease caused by quinolinic acid.
- All analogs produced less methemoglobinemia when compared with dapsone.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 October 2011

Received in revised form 25 August 2012

Accepted 28 August 2012

Keywords:

Dapsone
Analog
Neuroprotection
Methemoglobin

ABSTRACT

The bacteriostatic agent 4,4'-diaminodiphenylsulfone or dapsone (DDS) and some of its *N,N'*-dialkylated analogs have shown anticonvulsant and neuroprotective properties in different experimental models. In this study, we tested the ability of five DDS analogs (*N,N*-dimethyldapsone, *N,N*-diethyldapsone, *N,N*-dipropyldapsone, *N,N*-dibutyldapsone and *N,N*-ditosyldapsone) to attenuate quinolinic acid-induced toxicity in vivo. Male Wistar rats were treated with either DDS or analogs (12.5 mg/kg and equimolar doses respectively) 30 min before quinolinic acid intrastriatal stereotaxic injection (240 nmol/μl). Six days after injury, circling behavior was evaluated by counting ipsilateral turns for 1 h after apomorphine challenge (1 mg/kg, sc). Twenty-four hours later, rats were sacrificed and their corpora striata were dissected out to determine GABA content. Hemotoxicity of the analogs was assessed as the ability to produce methemoglobin (MHB) in vivo. Blood was sampled from tail vein within 18 h after drugs administration. Methemoglobin levels were determined by visible spectrophotometry and mean profiles of MHB-percentage versus time were obtained. All of the analogs tested decreased the number of ipsilateral turns/hour, reducing up to 67% the turns counting ($p < 0.05$) when compared to those induced in animals receiving quinolinic acid with no treatment. *N,N*-dimethylated, *N,N*-diethylated and *N,N*-dibutyldated analogs significantly prevented the decrease of intrastriatal GABA content ($p < 0.05$). Methemoglobin produced by the administration of analogs was significantly lower than the levels of the group receiving dapsone ($p < 0.05$). The neuroprotective effect of analogs and their diminished hemotoxicity make them potential candidates for therapeutic applications.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The bacteriostatic agent 4,4'-diaminodiphenylsulfone (dapsone, DDS) is a sulfone used during the last seven decades for the treatment of leproae. Because of its anti-inflammatory properties, it is also used in the treatment of several conditions, such as inflammatory bowel disease, rheumatic connective tissue disorders, dermatitis herpetiformis and brown recluse spider bites, among others [35,36,39]. However the use of DDS is restricted

* Corresponding author at: Neurochemistry Department, National Institute of Neurology and Neurosurgery "Manuel Velasco Suárez", Av. Insurgentes Sur # 3877, Col. La Fama, Del. Tlalpan, México D.F., C.P. 14209, Mexico.
Tel.: +52 555003822x2000; fax: +52 5554240808.
E-mail address: crios@correo.xoc.uam.mx (C. Ríos).

due to hemotoxic effects attributed to N-hydroxylated metabolites, which are formed during the hepatic activation of the parent drug [23].

Several studies have tested the efficacy of dapsone and some of its analogs, including the N,N'-dimethylated one in different experimental models, evidencing a dose-dependent anticonvulsant and neuroprotective effect (for 12.5 mg/kg and higher doses) against several markers of excitotoxic damage triggered by over-activation of glutamate ionotropic receptors [1,8,11,13,24,26,27]. Additional toxicological evidence, has shown that some symmetric N,N'-dialkylated analogs of DDS, were effective in reducing *in vitro* methemoglobin formation in microsomal preparations of male Sprague-Dawley rats [23,29,39].

On the other hand, intrastriatal administration of Quinolinic acid (Quin), an endogenous selective agonist of NMDA type glutamate receptors is extensively used as an experimental model of excitotoxicity to define all its physiological roles and its participation in a wide variety of pathological processes [28,30,31]. As excitotoxicity is one of the main mechanisms associated to several human pathologies of the central nervous system; such as ischemia, epilepsy, trauma and to different neurodegenerative disorders such as Huntington, Parkinson and Alzheimer's diseases [14,15,22]; and due to the existing evidence about potential neuroprotection by N,N'-dialkylated analogs of DDS and their diminished toxicological profiles *in vitro*, we have conducted a first approach molecular screening test of 5 different molecules (4 symmetrically alkylated analogs in their aromatic amines groups and one intermediary of the analogs synthesis reaction) in order to determine if some of them exerted protection against some characteristic features in the model of excitotoxicity derived from Quin intrastriatal administration.

2. Materials and methods

2.1. Drugs and reagents

All compounds tested in this study were synthesized, purified (>99.0%) and characterized by ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance and mass spectroscopy. Details concerning chemical synthesis and characterization of molecules are to be published separately.

Quin, DDS, *o*-phthalaldehyde, 3-mercaptothiopropanoic acid, 2-mercaptoethanol, γ -aminobutyric acid and dimethyl sulfoxide were all obtained from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA), apomorphine hydrochloride was purchased from ICN products (Aurora, OH, USA), glacial acetic acid from J.T. Baker (Darmstadt, Germany) and HPLC-grade methanol and acetonitrile from Mallinckrodt (Paris, KY, USA).

2.2. Animals

Male Wistar rats weighing 270–320 g were used throughout. Animals were maintained under standard conditions with *ad libitum* access to water and food. Protocols for animal use and care were provided by the vivarium from the Center of Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute (CINVESTAV-IPN, Zacatenco) in Mexico City and the established guidelines by the Mexican Health Regulation (Chapter 7: Of research regarding the use of laboratory animals).

2.3. Drug treatments

Dapsone, N,N'-dialkylated analogs and additionally the N,N'-ditosylated intermediary of the synthetic route were dissolved in dimethyl sulfoxide (0.014 M/kg). Quin solution (240 nmol/ μl) was

prepared by dissolving quinolinic acid in physiologic saline solution buffered to pH to 7.4.

Rats (8–12 per group) were administered intraperitoneally with DDS (12.5 mg/kg) or equimolar doses of the 5 analogs tested, 30 min before the intrastriatal injection of Quin. After pre-treatment, animals were anesthetized with sodium pentobarbital (40 mg/kg, i.p.). Animals from sham group were administered only with vehicle (DMSO).

2.4. Quinolinic acid intrastriatal administration

A single unilateral injection of 1 μl over 2 min of the Quin solution was infused into the right striatum of rats, using the following coordinates: 0.5 mm anterior to bregma, 3.0 mm lateral to bregma and 4.5 ventral to the dura as characterized in the Paxinos and Watson rat brain atlas [19]. Animals from Sham group were injected with physiologic saline solution.

2.5. Circling behavior test

Circling behavior was evaluated 6 days after the intrastriatal injury as reported by Pérez-Severiano et al. [21]. All rats were administered with apomorphine hydrochloride (1 mg/kg) dissolved in 1% ascorbic acid in physiologic saline solution and separated in acrylic cages to register the number of complete ipsilateral turns to the injured striatum for 60 min.

2.6. Determination of striatal GABA content

Striatal GABA content was determined by HPLC (Agilent 1100 series system with an adsorbosphere OPA HS 5 μm particle, 100 \times 4.6 mm column) as reported previously by Perez-Neri et al. [20]. *Corpora striata* were dissected-out 7 days after excitotoxic damage with Quin and kept at -70°C until analysis. In order to avoid the post-mortem GABA formation, each rat was intravenously injected with the glutamic acid decarboxylase (GAD) inhibitor, β -mercaptothiopropanoic acid (1.2 mM/kg) 3 min before dissecting the corpus striatum.

Striatal homogenates were prepared by sonicating tissue samples in 20 volumes of 85% HPLC-grade methanol. Homogenates were centrifuged at 18,500 rpm for 15 min at 4 $^\circ\text{C}$. Supernatants were analyzed using fluorescent detection (excitation $\lambda = 232\text{ nm}$; emission $\lambda = 455\text{ nm}$) following pre-column *o*-phthalaldehyde-mercaptothiopropanoic acid derivatization [20].

Chromatograms were integrated and processed using the Chemstation Software (Rev. 10.02) by Agilent Technologies.

2.7. Determination of methemoglobin in blood

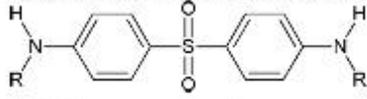
To determine hemotoxicity produced by the metabolism of the N,N'-dialkylated dapsone analogs, methemoglobin percentage versus time profiles were obtained from 6 to 8 rats. Blood sampling was carried-out from the tail vein at 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 and 16 h, after a single intraperitoneal dose of dapsone (25 mg/kg) or equimolar doses of the analogs.

Methemoglobin percentage was determined by the modified visible spectrophotometric method of Evelyn and Malloy based in methemoglobin ($\lambda = 630\text{ nm}$) conversion to cyanmethemoglobin ($\lambda = 540\text{ nm}$). Methemoglobin percentage area under the curve (AUC) versus time profiles were obtained [5,12].

2.8. Data analysis

Data from circling behavior counting and striatal GABA content did not show homocedasticity, among experimental groups, which

Table 1
Chemical structure and abbreviations of the molecules evaluated.



Molecule	R	Abbreviation in text
4,4'-Diaminodiphenylsulfone	—H	DDS
N,N-Dimethyl-4,4'-diaminodiphenylsulfone	—CH ₃	Me-DDS
N,N-Diethyl-4,4'-diaminodiphenylsulfone	—CH ₂ —CH ₃	Et-DDS
N,N-Dipropyl-4,4'-diaminodiphenylsulfone	—(CH ₂) ₂ —CH ₃	Pr-DDS
N,N-Dibutyl-4,4'-diaminodiphenylsulfone	—(CH ₂) ₃ —CH ₃	Bu-DDS
N,N-Ditosyl-4,4'-diaminodiphenylsulfone	—SO ₂ —C ₆ H ₄ —CH ₃	Tos-DDS

is the main assumption of parametric analyses, not even after logarithmic transformation. Consequently, non-parametric analysis of variance Kruskal–Wallis test, followed by multiple comparisons Mann–Whitney's *U*-test was used. The analysis of methemoglobin area under the curve data was carried out using an ANOVA followed by a multiple comparison Tukey test. Spearman's Rho correlation coefficient was calculated between GABA content and circling behavior. All statistical analyses were performed using the SPSS v 15.0 software for Windows.

3. Results

3.1. Circling behavior test

The chemical structure of the molecules under study and the abbreviations used are shown in Table 1.

Fig. 1A shows the circling behavior data. Dapsone, the four N,N-alkylated analogs and the N,N-ditosylated intermediary showed significantly less turns when compared with the group receiving only intrastriatal Quin ($p < 0.05$). Among the DDS analogs, the highest protection was observed in the group administered with the Me-DDS analog, decreasing the number of ipsilateral turns by 67.6%, while the group receiving the Et-DDS analog decreased the

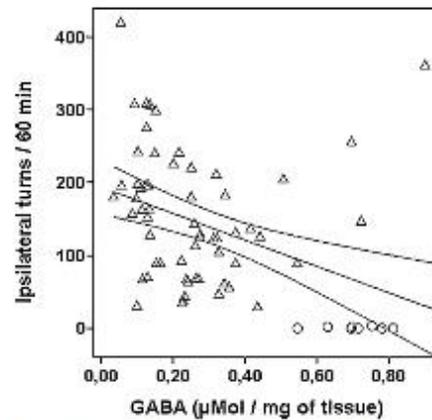


Fig. 2. Bivariate correlation between ipsilateral turns and striatal GABA content. Spearman's Rho coefficient = -0.487 , ($p < 0.01$). ○ Sham group, △ Injured groups (Quin and Quin + analogs treatment).

frequency of turns by 33.4%. As expected, Sham group did not show circling behavior.

3.2. Determination of striatal GABA content

Results from striatal GABA analyses are shown in Fig. 1B. Quinolinic acid reduced by 82% the striatal content of the neurotransmitter as compared to the Sham group ($p < 0.05$). DDS and Et-DDS were the molecules providing the highest protection against Quin-induced GABA depletion, with 49.4 and 50.3% reductions respectively.

A -0.487 Spearman's Rho coefficient correlation was obtained ($p < 0.01$), corroborating the linear relationship between the number of ipsilateral turns and the GABA content of *corpus striatum*. Correlation remained significant with a -0.294 coefficient when subanalysis of data with only injured groups is done ($p < 0.05$) (Fig. 2).

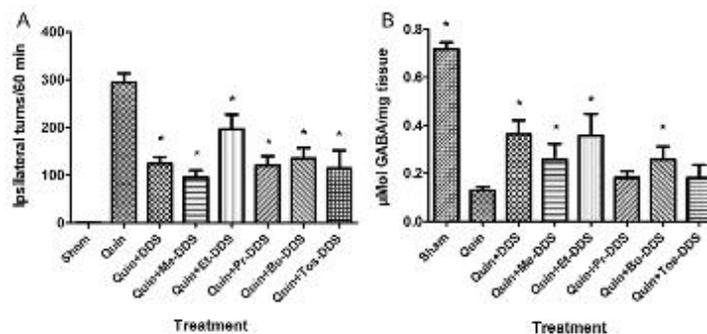


Fig. 1. (A) Ipsilateral turns induced by apomorphine (1 mg/kg sc) 0 days after intrastriatal Quin (240 nmol/µl) administration. Data are presented as mean \pm SEM from 8 to 12 rats. Asterisk denotes a significant difference when compared with the damage-control group (Quin), as determined by Mann–Whitney *U*-test, ($p < 0.05$) preceded by Kruskal–Wallis test. No turns were observed in the Sham group. (B) Striatal GABA levels from experimental groups. Data are presented as mean \pm SEM from 8 to 12 rats. Asterisks denote a significant difference determined by Mann–Whitney *U*-test, ($p < 0.05$) when compared with the Quin group. This analysis was preceded by Kruskal–Wallis test.

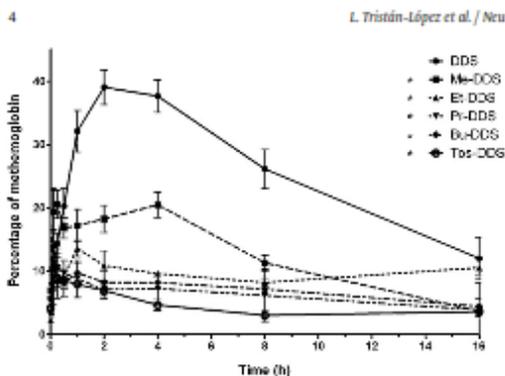


Fig. 3. Methemoglobin-time profiles obtained during 16h after intraperitoneal administration of the different molecules tested. Data are presented as mean \pm SEM from 6 to 8 rats. Asterisks denote statistical difference determined by one-way ANOVA followed by Tukey test ($p < 0.05$), in area under the curve (AUC) of DDS analogs compared to the AUC from DDS group.

3.3. Determination of methemoglobin in blood

The area under the curve (AUC) of methemoglobin percentage produced by each of the analogs was significantly lower ($p < 0.05$) than the area produced by DDS administration, taking the effect (AUC) elicited by the original molecule as 100%. The decrease in the hemotoxic effect ranged from 31.5% for Me-DDS to almost 71% for the Tos-DDS intermediary (Fig. 3).

4. Discussion

The search for new therapeutic options for neurologic diseases related to NMDA receptors induced-excitotoxicity in conjunction with the anticonvulsant and neuroprotective properties exerted by DDS and some analogs in several experimental studies, suggests that diaminodiphenyl molecules could modulate the NMDA glutamate receptors indirectly [37]. However, binding studies carried out by Bence et al. [3], have evidenced that DDS does not directly interact with polyamines nor the MK-801 binding sites in the NMDA-type receptors, identifying structural characteristics in some analogs to displace spermidine and dizolcipine from their interaction sites and generating new questions about the mode of action of dapsone and its analogs on NMDA receptor function. It has also been proposed that an unknown metabolite from the original molecule could be responsible for attenuating the damage triggered by NMDA receptor activation. This fact encouraged us to study DDS molecular modifications in order to test derivatives with therapeutic potential.

Results from the present work suggest neuroprotective properties by analogs of DDS against some end-point markers of intrastriatal quinolinic acid-induced neurotoxicity since the sparing of the GABAergic neurons of striatum was demonstrated for some of the molecules by the prevention of circling behavior and GABA depletion, which are reliable reported markers of the preservation and functionality of the remaining tissue in rats intrastrially lesioned with quinolinic acid [21,26–28]. Nevertheless, the limitations of this study include the impossibility to determine if protective effects found in our experiments are attributable to tested molecules or to some chemical moiety derived from metabolism.

Me-DDS and Et-DDS analogs showed the most promising profiles, because they diminished circling behavior and preserved GABA content at levels comparable to DDS, while showed less

hemotoxicity than the original molecule. The possible mechanisms of action of DDS as neuroprotective and anticonvulsant agent are: increasing neuronal inhibition mediated by GABAergic cells, prevention of Ca^{2+} influx, similar to the one produced by the anticonvulsant drug zonisamide, and protection against inflammation through inhibition of some calcium-dependent functions of neutrophils, such as activation of proteases and oxidizing species production (e.g. hydrogen peroxide and hypochlorous acid) [4,17,24,25,32].

Antioxidant properties of dapsone are well documented by previous studies. Rodriguez et al. [26] reported decreased lipid peroxidation in rats pre-treated with dapsone (12.5 mg/kg) after Quin intrastriatal injection model of excitotoxicity. Other antioxidant properties have been reported for this sulfone as a free radical scavenger and for its ability to inhibit cytotoxic hydrogen peroxidase and myeloperoxidase enzymes. However, the activity of N-alkylated analogs of DDS over markers of oxidative and inflammatory damage (lipid peroxidation, ROS and RNS formation, nNOS activation and IL-1 β expression) in this experimental model is yet to be determined [6,38].

We believe the DDS-Pr and DDS-Tos analogs pattern, in which protection against circling behavior was observed without striatal GABA content preservation, could be related with the effect of these molecules on the remaining tissue after Quin injury, probably influencing the dopaminergic system, since this particular behavioral test is based on the lateral imbalance of dopaminergic receptors in the striatum-injured animal. Another possibility could be that these particular molecules could increase GABA turnover in the remaining tissue after injury. These possibilities deserve further studies.

Seydel et al. [29], have reported a significant reduction of approximately 75% in methemoglobin production of N,N-dimethylated analog versus dapsone under *in vitro* conditions. In concordance, we have found an *in vivo* methemoglobin reduction of 31% for the same molecule, adding evidence to its toxicological profile. As we observed in our study, reduced methemoglobin formation up to 30% from that of DDS, is directly related to increased bulk of the N-alkyl substituent that in turn could be inhibiting the formation of aromatic hydroxylamines caused by the metabolic intermediaries derived from the N-dealkylation of amino groups. The notorious decrease in the formation of the original molecule (DDS) and its mono-acetylated metabolite, both precursors of hemoglobin-oxidizing species and the slowing of the microsomal N-hydroxylation rate, derive from the addition of an alkyl substituent on the aromatic amine groups [7,18,33].

On the other hand, DDS penetration through BBB has been previously demonstrated by measuring the sulfone in brain tissue from Lewis rats and in human by determining its content in CSF samples obtained from AIDS patients receiving prophylactic treatment for encephalitis caused by *Toxoplasma gondii* and *Pneumocystis carinii* pneumonia [9,10,16]. In this study, we increased symmetric aliphatic chain substituents in the analogs, trying to preserve theoretical properties that allow their pass through the blood brain barrier (BBB), including, water-octanol partition coefficient between 1 and 4, molecular weight lower than 400 and a polar surface area $\leq 90 \text{ \AA}^2$ [34]. We have also included the N,N-ditosylated reaction intermediary, because even when this molecule exceeds the ideal parameters, it preserves the 4,4'-diaminodiphenyl structure with additional sulfonamide chemical moieties which are present in several anticonvulsant drugs like zonisamide and topiramate [2]. All of the proposed analogs produced detectable quantities of DDS in CSF and plasma as a product of metabolism (data not shown). However Et-DDS showed a remarkable metabolic formation of the original sulfone which reached up to ten times the concentration produced by the other analogs, suggesting that its profile would fit as a pro-drug.

Even when several mechanistic features of the analogs activity currently remain to be elucidated, screening of these molecules have provided us with relevant experimental evidence to make them interesting options to continue studying them as possible neuroprotective therapeutic agents.

Contributors

The research project was conceptualized by Camilo Ríos, organized by Víctor Pérez-Álvarez, Francisca Pérez-Severiano and Camilo Ríos, and executed by Luis Tristán-López, Sergio Montes, Iván Pérez-Neri and Liliana Rivera-Espinosa.

Statistical analysis was designed by Camilo Ríos, executed by Luis Tristán-López and Camilo Ríos, and reviewed and critiqued by Víctor Pérez-Álvarez, Francisca Pérez-Severiano, Sergio Montes and Camilo Ríos.

First draft of the manuscript was written by Luis Tristán-López, and reviewed and critiqued by Sergio Montes and Camilo Ríos.

Acknowledgments

This study was partially supported by CONACYT-México research Grant 61327 to F. Pérez-Severiano. L. Tristán-López, received a fellowship from CONACYT-México (fellowship number: 207021) and wishes to thank Isabel Wens Flores and Rosa Elena Flores Beltrán for their technical support to carry-out this work.

References

- M. Altgracia, A. Monroy-Noyola, L. Osorio-Rico, J. Kravtsov, R. Alvarado-Calvillo, J. Manjarrez-Marmolejo, C. Ríos, Dapsone attenuates kainic acid-induced seizures in rats, *Neuroscience Letters* 176 (1994) 52–54.
- L.A. Barrios, L.E. Bruno-Blanch, G.L. Estiú, Pharmacophoric pattern of anti-epileptic sulfonamides and sulfamates. Theoretical study of the associated requirements, *Journal of Molecular Structure* 580 (2002) 243–250.
- A.K. Bence, D.T. Rogers, D.R. Worthen, M. Fu, J.M. Littleton, P.A. Crooks, Dapsone analogs as potential polyamine binding site modulators of the N-methyl-D-aspartate receptor complex, *Drug Development Research* 51 (2000) 268–272.
- S.M. Debol, M.J. Herron, R.D. Nelson, Anti-inflammatory action of dapsone: inhibition of neutrophil adherence is associated with inhibition of chemoattractant-induced signal transduction, *Journal of Leukocyte Biology* 62 (1997) 827–836.
- K.A. Evelyn, H.T. Malloy, Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin and sulhemoglobin in a single sample of blood, *Journal of Biological Chemistry* 126 (1938) 655–662.
- M.F. Fredenberg, F.D. Malkinson, Sulfone therapy in the treatment of leukocytoclastic vasculitis. Report of three cases, *Journal of the American Academy of Dermatology* 16 (1987) 772–778.
- G. Galliani, M. Nali, B. Rindone, S. Tollari, M. Rocchetti, M. Salmona, The rate of N-demethylation of N,N-dimethylanilines and N-methylanilines by rat-liver microsomes is related to their first ionization potential, their lipophilicity and to a steric bulk factor, *Xenobiotica* 16 (1986) 511–517.
- G. García-Arenas, F.J. Flores-Muñiz, C. Ríos, Anticonvulsive effect of dapsone: interaction with phenytoin in the kainic acid model of seizures, *Proceedings of the Western Pharmacology Society* 40 (1997) 95–96.
- G. Gatti, J. Hossein, M. Malena, M. Cruciani, M. Bassetti, Penetration of dapsone into cerebrospinal fluid of patients with AIDS, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 40 (1997) 113–115.
- J.A. Gratton, M.H. Abraham, M.W. Bradbury, H.S. Chadha, Molecular factors influencing drug transfer across the blood–brain barrier, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 49 (1997) 1211–1216.
- K. Hamada, T. Hiyoshi, S. Kobayashi, S. Ishida, K. Yagi, M. Seino, Anticonvulsive effect of dapsone (4,4-diaminodiphenyl sulfone) on amygdala-kindled seizures in rats and cats, *Epilepsy Research* 10 (1991) 93–102.
- J.H. Harrison, D.J. Jollow Jr., Role of aniline metabolites in aniline-induced hemolytic anemia, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 238 (1986) 1045–1054.
- S. Ishida, K. Hamada, K. Yagi, M. Seino, Comparing the anticonvulsive effects of dapsone on amygdala-kindled seizures and hippocampal-kindled seizures in rats, *Acta Neurologica Scandinavica* 85 (1992) 132–135.
- E. Koutsilieris, P. Riederer, Excitotoxicity, new anticholinergic strategies in Parkinson's disease and Alzheimer's disease, *Parkinsonism and Related Disorders* 13 (Suppl. 3) (2007) S329–S331.
- I. Mody, J.F. MacDonald, NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular Ca^{2+} release, *Trends in Pharmacological Sciences* 16 (1995) 356–359.
- J.F. Murray, G.R. Gordon, J.H. Peters, Tissue levels of dapsone and monoacetyl-dapsone in Lewis rats receiving dietary dapsone, *Western Pharmacology Society* 17 (1974) 150–154.
- J. Nader-Kawachi, F. Góngora-Rivera, J. Santos-Zambrano, P. Calzada, C. Ríos, Neuroprotective effect of dapsone in patients with acute ischemic stroke: a pilot study, *Neurological Research* 29 (2007) 331–334.
- R.N. Pandey, A.P. Armstrong, P.F. Hollenberg, Oxidative N-demethylation of N,N-dimethylaniline by purified isozymes of cytochrome P-450, *Biochemical Pharmacology* 38 (1989) 2181–2185.
- G. Paxinos, in: G. Paxinos, C. Watson (Eds.), *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Elsevier, Amsterdam, 2007, Fig. 29.
- I. Pérez-Neri, E. Castro, S. Montes, M.C. Roll, J. Barges-Coll, J.L. Soto-Hernández, C. Ríos, Arginine, citrulline and nitrate concentrations in the cerebrospinal fluid from patients with acute hydrocephalus, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 851 (2007) 250–256.
- F. Pérez-Severiano, M. Rodríguez-Perer, J. Pedraza-Chaverrí, P.D. Maldonado, O.N. Medina-Campos, A. Ortiz-Plata, A. Sánchez-García, J. Villeda-Hernández, S. Galvan-Arzate, F. Aguilera, A. Santamaría, S-allylcysteine a garlic-derived antioxidant, ameliorates quinolinic acid-induced neurotoxicity and oxidative damage in rats, *Neurochemistry International* 45 (2004) 1173–1182.
- L.A. Raymond, Excitotoxicity in Huntington disease, *Clinical Neuroscience Research* 3 (2003) 121–128.
- T.P. Reilly, P.M. Woster, C.K. Svensson, Methemoglobin formation by hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone: implications for differences in adverse drug reactions, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 288 (1999) 991–999.
- C. Ríos, M. Altgracia, J. Kravtsov, A. Monroy-Noyola, R. Alvarado-Calvillo, J. Manjarrez-Marmolejo, L. Osorio-Rico, EEG evaluation of the anticonvulsive effect of dapsone in the kainic acid model of epilepsy, *Proceedings of the Western Pharmacology Society* 36 (1993) 259–261.
- C. Ríos, J. Nader-Kawachi, A.J. Rodríguez-Payan, C. Nava-Ruiz, Neuroprotective effect of dapsone in an occlusive model of focal ischemia in rats, *Brain Research* 999 (2004) 212–215.
- E. Rodríguez, M. Méndez-Armenta, J. Villeda-Hernández, S. Galvan-Arzate, R. Barroso-Moguel, F. Rodríguez, C. Ríos, A. Santamaría, Dapsone prevents morphological lesions and lipid peroxidation induced by quinolinic acid in rat corpus striatum, *Toxicology* 139 (1999) 111–118.
- A. Santamaría, J. Ordaz-Moreno, M. Rubio-Osorio, F. Solís-Hernández, C. Ríos, Neuroprotective effect of dapsone against quinolinic- and kainate-induced striatal neurotoxicities in rats, *Pharmacology and Toxicology* 81 (1997) 271–275.
- R. Schwarcz, P. Guidetti, K.V. Sathyaikumar, P.J. Muchowski, Of mice, rats and men: revisiting the quinolinic acid hypothesis of Huntington's disease, *Progress in Neurobiology* 90 (2010) 230–245.
- J.K. Seydel, H. Bürger, A.K. Saxena, M.D. Coleman, S.N. Smith, A.D. Ferris, Quantitative structure–activity structure–toxicity relationships of 4-aminodiphenyl sulphone derivatives with antiinflammatory activity, *Quantitative Structure: Activity Relationships* 18 (1999) 43–51.
- T.W. Stone, Endogenous neurotoxins from tryptophan, *Toxicol* 39 (2001) 61–73.
- T.W. Stone, M.N. Perkins, Quinolinic acid: a potent endogenous excitant at amino acid receptors in CNS, *European Journal of Pharmacology* 72 (1981) 411–412.
- T. Suda, Y. Suzuki, T. Matsui, T. Inoue, O. Niide, T. Yoshimaru, H. Suzuki, C. Ra, T. Ochiai, Dapsone suppresses human neutrophil superoxide production and elastase release in a calcium-dependent manner, *British Journal of Dermatology* 152 (2005) 887–895.
- C. Vage, N. Saab, P.M. Woster, C.K. Svensson, Dapsone-induced hematologic toxicity: comparison of the methemoglobin-forming ability of hydroxylamine metabolites of dapsone in rat and human blood, *Toxicology and Applied Pharmacology* 129 (1994) 309–316.
- H. van de Waterbeemd, G. Camenisch, G. Folkers, J.R. Chretien, O.A. Raevsky, Estimation of blood–brain barrier crossing of drugs using molecular size and shape, and H-bonding descriptors, *Journal of Drug Targeting* 6 (1998) 151–165.
- R. Wolf, H. Matz, E. Orion, B. Tuzun, Y. Tuzun, Dapsone, *Dermatology Online Journal* 8 (2002) 2.
- R. Wolf, B. Tuzun, Y. Tuzun, Dapsone: unapproved uses or indications, *Clinics in Dermatology* 18 (2000) 37–53.
- D.R. Worthen, A.K. Bence, J.P. Stables, P.A. Crooks, In vivo evaluation of diaminodiphenyls: anticonvulsant agents with minimal acute neurotoxicity, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 19 (2009) 5012–5015.
- G. Wozel, B. Lehmann, Dapsone inhibits the generation of 5-lipoxygenase products in human polymorphonuclear leukocytes, *Skin Pharmacology* 8 (1995) 196–202.
- Y.I. Zhu, M.J. Stiller, Dapsone and sulfones in dermatology: overview and update, *Journal of the American Academy of Dermatology* 45 (2001) 420–434.