

302827

Nº 15  
2E4



UNIVERSIDAD MOTOLINIA, A.C.

ESCUELA DE QUIMICA  
CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U. N. A. M.

ESTUDIO DE TOLERANCIA AL EFECTO  
ANTICONVULSIONANTE DE LA  
4-HIDROXI-4-ETIL-4-FENIL BUTIRAMIDA (HEPB)  
Y SU HOMOLOGO INFERIOR  
3-HIDROXI-3-ETIL-3-FENIL PROPIONAMIDA (HEPP)

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

**DOLORES MOLINA JASSO**

MEXICO, D. F.

1994

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**Con cariño y respeto  
a mis padres**

**Catalina Jasso García**

**J. Medardo Molina Ramos**

**Por su apoyo y orientación  
en cada etapa de la vida,  
dedicándoles mis futuras realizaciones.**

**Mi agradecimiento a**

**Dr. Germán Chamorro Cevallos**

**M. en C. Marfa Salazar Jacobo**

**Q.F.I. Silvia Salazar Jacobo**

**Por los conocimientos compartidos,  
por su confianza y apoyo  
para realizar esta tesis.**

**Con estimación y respeto a**

**Dra. Lisbeth E. Gómez Martínez**

A los profesores

Dra. Teresa Dávila Partida

Q. Marco Antonio Chávez

Por los conocimientos brindados  
para la realización de este trabajo.

A mis compañeros de Toxicología

Jaqueline, Leticia y Toño

Por su amistad y colaboración  
para realizar esta tesis.

**Mi agradecimiento a**  
**Dr. Guillermo Carvajal Sandoval**  
**Por proporcionarnos los fármacos utilizados**  
**en este trabajo.**

**Al honorable jurado**

**Q.F.B. Graciela Sosa G.**

**Q.F.B. Evangelina Barbosa R.**

**Q.F.B. Francisco López N.**

**M.C. Ricardo Alejandro A.**

**Q.B.P. Luis Isita Tornell.**

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE TOXICOLOGIA PRECLINICA DEL DEPTO. DE FARMACIA DE LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLOGICAS DEL I.P.N., BAJO LA DIRECCION DEL DR. GERMAN CHAMORRO CEVALLOS Y LA DRA. LISBETH E. GOMEZ MARTINEZ.



## INDICE

### CAPITULO I

#### INTRODUCCION

1.1. Planteamiento del problema.....	1
1.2. Objetivos.....	2
1.3. Hipótesis.....	2

### CAPITULO II

#### ANTECEDENTES

2.1. Epilepsia.....	3
2.2. Clasificación de la epilepsia.....	4
2.3. Causas de la epilepsia.....	8
2.4. Modelos experimentales de epilepsia.....	10
2.4.1. Estimulación eléctrica.....	11
2.4.2. Especies animales como modelos naturales de epilepsia.....	11
2.4.3. Inducción del proceso epiléptico por aplicación tópica de sustancias irritantes.....	12
2.4.4. Inducción por administración sistémica de sustancias convulsionantes.....	12
2.4.5. Modelo de infusión intravenosa de pentilen tetrazol (PTZ).....	12
2.5. Aplicación de modelos experimentales de epilepsia.....	13
2.6. Fármacos antiepilépticos.....	14
2.6.1. Mecanismos de acción de fármacos antiepilépticos.....	17
2.6.2. Importancia del ácido gamma aminobutírico (GABA) en la generación del proceso epiléptico.....	18
2.6.3. Fármacos antiepilépticos clásicos y su relación con la tolerancia.....	23
2.6.4. Cuantificación de fármacos antiepilépticos.....	25
2.6.4.1. Cromatografía de gases.....	25

2.7. Tolerancia.....	30
2.7.1. Tipos de tolerancia.....	31
2.7.2. Mecanismos de tolerancia.....	33
2.8. Importancia de los estudios preclínicos de fármacos en desarrollo.....	35
2.9. Fármacos antiepilépticos sintetizados en México.....	37
2.10. Estudios farmacológicos y toxicológicos de los anticonvulsionantes sintetizados en México.....	39

### **CAPITULO III**

#### **PARTE EXPERIMENTAL**

3.1. Diagrama general.....	41
3.2. Material, reactivos y equipo.....	42
3.2.1. Material biológico.....	42
3.2.2. Material de laboratorio.....	42
3.2.3. Equipo.....	42
3.2.4. Reactivos.....	43
3.2.4.1. Preparación de reactivos.....	43
3.2.4.2. Preparación de fármacos.....	44
3.3. Metodología.....	44
3.3.1. Acondicionamiento de animales.....	44
3.3.2. Tratamiento anticonvulsivo.....	45
3.3.3. Prueba convulsiva.....	46
3.3.4. Determinación de la 3-hidroxi-3-etil-3-fenil- propionamida (HEPP) en plasma.....	46
3.3.4.1. Condiciones cromatográficas.....	47

### **CAPITULO IV**

#### **RESULTADOS Y DISCUSION**

4.1. RESULTADOS.....	48
4.2. DISCUSION.....	58

### **CAPITULO V**

CONCLUSIONES.....	60
BIBLIOGRAFIA.....	61

# CAPITULO I

## INTRODUCCION

### 1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En la farmacoterapia existen numerosos fármacos que están sujetos a un control en su prescripción, debido a que tienen un uso constante y repetido y son capaces de producir dependencia física y tolerancia, efectos que deben detectarse para lograr una adecuada terapia para el paciente (6).

Dentro de este grupo se encuentran los medicamentos que actúan sobre el Sistema Nervioso Central, en particular, los antiepilépticos, que son fármacos utilizados en el tratamiento de enfermedades epilépticas, las cuales se caracterizan por sacudidas recurrentes causadas por una descarga anormal de las neuronas cerebrales (57).

El tratamiento de la epilepsia involucra una administración continua del fármaco, en la que se ha observado que la intensidad de la respuesta disminuye con la misma dosis, lo que obliga a aumentarla para obtener el efecto inicial. Esta capacidad del organismo de presentar una respuesta menor hacia el fármaco tras su administración repetida, recibe el nombre de tolerancia (43,58), la cual es una limitante en la terapia de padecimientos epilépticos. Por ello el presente trabajo tiene como objetivo, evaluar el posible desarrollo de tolerancia de una serie homóloga de fármacos antiepilépticos sintetizados en México por el grupo de Carvajal (51), los cuales han mostrado un amplio espectro de actividad con un índice de toxicidad bastante bajo.

## 1.2. OBJETIVOS

- 1) Evaluar el desarrollo de tolerancia al efecto anticonvulsionante del fármaco 3-hidroxi-3-etil-3-fenil propionamida (HEPP).
- 2) Evaluar el desarrollo de tolerancia al efecto anticonvulsionante del fármaco 4-hidroxi-4-etil-4-fenil butiramida (HEPB).
- 3) Determinar si existe relación entre el desarrollo de tolerancia y la concentración plasmática de estos fármacos.

## 1.3 HIPOTESIS

Si el desarrollo de tolerancia provoca una disminución en el efecto antiepiléptico, será posible entonces, cuantificar la concentración del fármaco en plasma y constatar si tal efecto se debe a una reducción en la concentración del fármaco en el organismo.

# CAPITULO II

## ANTECEDENTES

### 2.1. EPILEPSIA

La epilepsia es un padecimiento frecuente del Sistema Nervioso Central, que por su alta prevalencia e incidencia, ha sido uno de los grandes problemas de la humanidad, por las consecuencias físicas, sociales y psicológicas para el individuo que la padece (28,62).

Desde tiempos de Hipócrates es conocida la epilepsia a la que se consideraba como una enfermedad sobrenatural y de causa divina. Durante la Edad Media, los casos epilépticos se encomendaban a la protección de Santos, ya que se pensaba que tenían poderes curativos invocándose a San Vito, de donde surge la expresión de "mal de San Vito" (4,78).

En México, en el Códice Badiano (1552) el médico azteca Martín de la Cruz, hace referencia a un tratamiento para la epilepsia. Tiempo después, John Hughlings Jackson, considerado el padre de los conceptos modernos de epilepsia, sugirió que las crisis eran causadas por "descargas eléctricas ocasionales, súbitas, excesivas, rápidas y locales de materia gris" (59). Sin embargo, es hasta el siglo XIX cuando se describen las características clínicas de los individuos que sufren epilepsia, gracias a los avances que se obtuvieron en las áreas de Anatomía y Fisiología que fueron la base para la interpretación de esta enfermedad (61).

Etimológicamente, la palabra epilepsia deriva del griego epilambaneim, que significa "ser sobrecogido bruscamente". Sin embargo, en 1973, la Liga Internacional Contra la Epilepsia y la Organización Mundial de la Salud, dieron la siguiente definición (62):

"La epilepsia es una afección crónica de etiología diversa, caracterizada por crisis recurrentes, debidas a una descarga excesiva de las neuronas cerebrales (crisis epilépticas), asociadas eventualmente con diversas manifestaciones clínicas y paraclínicas".

En este padecimiento la actividad excesiva e incontrolada se puede presentar en todo el Sistema Nervioso Central o en una parte de él, por lo que las manifestaciones dependerán del sitio de la descarga, con períodos asintomáticos que pueden durar minutos, días, meses o años, con inicio y reaparición impredecibles. Por esta razón, si se efectúa un estudio detallado de las manifestaciones y de los síntomas, permitirá elaborar un diagnóstico adecuado, el cual podrá indicar el tratamiento que mejor se adapte al paciente (33,62).

La epilepsia se manifiesta en todas las edades, en el 76.8% se presenta antes de la adolescencia, el 16.3% aparece en el adulto joven, el 5.2% en el adulto y el 1.7% en los ancianos. En el caso de México, la prevalencia de la epilepsia es del 1.8% incluyendo niños, jóvenes y adultos en edad reproductiva (62).

## **2.2. CLASIFICACION DE LA EPILEPSIA**

La finalidad de clasificar las crisis epilépticas es para poder identificarlas correctamente, así como para seleccionar el tratamiento específico, ya que el fármaco se elige de acuerdo a la variedad clínica de la crisis (57).

En 1981 la Liga Internacional Contra la Epilepsia clasificó a la epilepsia en base a sus características clínicas y encefalográficas, dividiéndola en los siguientes grupos, (12,62):



- I. Crisis Parciales (focales o locales)
  - a. Convulsiones parciales simples.
  - b. Convulsiones parciales complejas.
  - c. Convulsiones parciales generalizadas de tipo secundario.
  
- II. Crisis Generalizadas (convulsivas o no convulsivas)
  - a. Crisis de ausencia.
  - b. Convulsiones mioclónicas.
  - c. Convulsiones clónicas.
  - d. Convulsiones tónicas.
  - e. Convulsiones tónico-clónicas.
  - f. Convulsiones atónicas.
  
- III. Crisis Epilépticas no Clasificables (aquellas de las que se tiene información incompleta o que no se pueden incluir en las otras categorías.
  
- IV. Adendum
  - a. Crisis repetitivas por diversas circunstancias.
    - i. Crisis fortuitas, que se presentan inesperadamente y sin provocación evidente.
    - ii. Crisis cíclica, que se presentan a intervalos regulares (ciclo de sueño-vigilia).
    - iii. Crisis provocadas por factores sensoriales (fatiga, emociones).
  - b. Crisis prolongadas o repetitivas (Status Epiléptico).

Las crisis epilépticas pueden presentar diferentes manifestaciones dependiendo de las neuronas afectadas. Cuando el sistema motor es el afectado, hay pérdida de control voluntario, espasmos tónicos (aumento de tono) o clónicos (contracción y relajación repetitivas) o ambos al mismo tiempo.

Cuando la zona afectada es una parte importante de la corteza cerebral o partes específicas del sistema activador reticular, el individuo pierde el conocimiento. Si la descarga ocurre en zonas sensoriales de la corteza cerebral, presenta alucinaciones de tipo visual, auditivo, gustativo, olfatorio o de la noción del tiempo, comúnmente llamadas auras (8).

En las crisis parciales la descarga anormal se limita a un sitio específico de la corteza cerebral (8,12). Estas crisis se clasifican en base a la alteración de la conciencia. Si la conciencia no se altera, se trata de una crisis parcial simple, que generalmente se inicia en un hemisferio, conservándose la agilidad mental (62).

Cuando la conciencia resulta alterada, es una crisis parcial compleja (12), el paciente puede tener una breve advertencia seguida por una alteración de la conciencia durante la cual puede sufrir una caída, pero la mayoría presentan automatismos (chasquear los labios, deglutir, manosear, rascarse) (57).

Otro tipo de convulsión parcial es la crisis generalizada secundaria, en la cual la crisis parcial progresa a un ataque generalizado tónico-clónico (Gran mal) (57,62).

Las crisis generalizadas son aquellas en las que no existe evidencia de un comienzo localizado (57). Es una descarga neuronal que se disemina a ambos hemisferios, con manifestaciones bilaterales, y con una probable alteración de la conciencia, que puede ser un síntoma inicial (62). Las crisis generalizadas tónico-clónicas (Gran mal) se caracterizan por descargas neuronales extremas en todas las áreas del cerebro e incluso en las áreas del sistema activador reticular.

Las descargas transmitidas provocan sacudidas tónicas en todo el cuerpo, con flexión de los miembros superiores y extensión forzada de los inferiores (33). La fase tónica es seguida por una clónica con contracciones musculares alternas en brazos y piernas que poco a poco ceden para entrar en una fase de quietud y recuperar gradualmente la conciencia (28).

Las crisis de ausencia (Pequeño mal) se caracterizan por una pérdida momentánea de la conciencia (15-45 segundos), el ataque puede asociarse con contracciones espasmódicas de extremidades, parpadeo ocular, automatismos. Este tipo de epilepsia suele presentarse en la infancia y desaparecer en la edad adulta (33,62).

Otro tipo de epilepsia generalizada, es la crisis atónica, que ocasiona una pérdida brusca del control de la postura, pero sin pérdida del conocimiento. Este tipo de ataque se observa en la niñez y es poco usual en adultos (8,57).

Los espasmos infantiles son crisis bilaterales que se incluyen en las convulsiones generalizadas, presentan sacudidas mioclónicas breves, con flexión o extensión súbita del torso y extremidades. Un gran porcentaje de los pacientes tienen el primer ataque antes del año de edad y la mayoría presentan retraso mental, probablemente a partir del mismo origen de los espasmos (57).

Cuando las crisis epilépticas son prolongadas o repetitivas reciben el nombre de Status Epilepticus, en el cual, la actividad convulsiva es generalizada, sin recuperación del conocimiento, presentándose crisis tras crisis sin recobrase después de la primera (28,33,62).

Este tipo de epilepsia pone en peligro la vida del individuo, teniendo que proporcionar tratamiento cardiovascular, respiratorio y metabólico, así como terapia farmacológica, la cual preferentemente se efectúa por vía endovenosa (57).

### 2.3. CAUSAS DE LA EPILEPSIA

La epilepsia se caracteriza por trastornos en la función del Sistema Nervioso Central, los cuales pueden surgir como resultado de muy diversos factores (28). Entre las causas más conocidas que pueden dar origen a las crisis epilépticas se encuentran las siguientes (2,8,54):

- 1) Factores genéticos.
- 2) Factores prenatales y del nacimiento (asfixia neonatal, traumatismo del parto, anomalías congénitas).
- 3) Infecciones (meningitis, encefalitis).
- 4) Sustancias tóxicas (plomo, mercurio, antidepresores, alcohol, penicilina).
- 5) Supresión de sustancias adictivas (barbitúricos).
- 6) Lesión cerebral (traumatismo craneoencefálico, hematoma).
- 7) Alteraciones metabólicas y nutricionales (desequilibrio de agua y electrolitos, hipoglucemia, hiperglucemia, deficiencia de piridoxina, hipocalcemia, hipercalcemia, hiponatremia).

- 8) Trastornos circulatorios (hemorragias subaracnoideas, oclusión arterial).
- 9) Tumores cerebrales.
- 10) Neurocisticercosis (causa importante en México)

Cualquiera que sea el origen de la epilepsia se puede decir que se presentan modificaciones bioquímicas o anatómicas que provocan alteraciones fisiológicas (63).

En cuanto a la alteración bioquímica se ven afectados los procesos de transmisión nerviosa que involucran el transporte de iones a través de las membranas o modificación en los niveles de neurotransmisores por cambio en la actividad de las enzimas que los sintetizan o alteración de los sistemas que los liberan o inactivan (64).

En las alteraciones anatómicas se han encontrado defectos en el proceso de mielinización tanto en ratas como en humanos, así como modificaciones en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (63).

La alteración que se presenta en la epilepsia consiste de descargas anormales de un grupo particular de células excitables (foco epiléptico), con depolarizaciones excesivas, rápidas y repetitivas, que se manifiestan clínicamente por las llamadas crisis convulsivas (32,68).

## 2.4. MODELOS EXPERIMENTALES DE EPILEPSIA

Uno de los puntos importantes en la fase de desarrollo de un fármaco antiepiléptico, es el de elegir el modelo animal que determine su actividad anticonvulsionante (41), ya que existe una limitación natural al tratar de estudiar la epilepsia en humanos mediante técnicas invasivas o ensayos farmacológicos, (68).

La necesidad de buscar modelos experimentales de epilepsia que semejen este padecimiento en humanos, ha determinado el uso de animales, principalmente mamíferos, que presenten manifestaciones eléctricas y conductuales semejantes a las humanas (61).

En algunas ocasiones estas manifestaciones son imposibles de evaluar satisfactoriamente, sobre todo si se presenta una falta de actividad motora, debido a las diferencias que existen entre la conducta animal y la humana (61).

Los modelos experimentales de epilepsia se pueden clasificar de acuerdo al procedimiento utilizado para la inducción de la convulsión de la siguiente manera (68):

### 1) Inducidos por agentes físicos.

Afectan receptores sensoriales o áreas encefálicas. Los estímulos utilizados para producir las crisis pueden ser eléctricos (electrochoque, "kindling"), acústicos o fóticos (especies animales susceptibles).

### 2) Inducidos por agentes químicos.

- Provocados por aplicación tópica: penicilina, crema de alúmina, polvo de cobalto.
- Por administración sistémica: bicuculina, picrotoxina, estriocnina, pentilentetrazol, 4-aminopiridina.

#### 2.4.1 ESTIMULACION ELECTRICA

Consiste en la aplicación de una corriente eléctrica de intensidad y duración determinadas a un animal para inducir las crisis epilépticas, que llegan a ser espontáneas sin que se repita la estimulación eléctrica (32,63).

Los métodos utilizados son el electrochoque y el "kindling". El electrochoque consiste en aplicar un estímulo eléctrico de intensidad suficiente para provocar la crisis convulsiva generalizada (63). El "kindling" consiste en una estimulación eléctrica de baja intensidad, aplicada en forma repetida a intervalos regulares para desarrollar crisis convulsivas generalizadas de forma espontánea (32,68).

#### 2.4.2 ESPECIES ANIMALES COMO MODELOS NATURALES DE EPILEPSIA

Existen animales genéticamente susceptibles a la aparición de crisis convulsivas que son desencadenadas por estímulos sensoriales, como los fóticos o los acústicos. Una de las ventajas de estos modelos es que las convulsiones pueden considerarse más naturales que las inducidas por métodos eléctricos o químicos (45). Las crisis se presentan como resultado de un aumento en la variedad, intensidad o frecuencia de los estímulos del medio ambiente experimental (68). Para este modelo se han utilizado animales como el Papión que presenta fotosensibilidad; el Gerbil que es sensible a un ambiente novedoso, manipulación física o luz brillante; así como ratas y ratones susceptibles al ruido, lo que provoca crisis convulsivas en ellos (45).

#### 2.4.3 INDUCCION DEL PROCESO EPILEPTICO POR APLICACION TOPICA DE SUBSTANCIAS IRRITANTES

La sustancia irritante se aplica sobre la corteza cerebral, induciéndose el proceso epiléptico en una zona restringida del tejido nervioso. Este modelo tiene una limitante en cuanto al análisis de la conducta animal, ya que se le anestesia e inmoviliza para su manejo experimental (68).

#### 2.4.4 INDUCCION POR ADMINISTRACION SISTEMICA DE SUBSTANCIAS CONVULSIONANTES

El agente convulsionante se administra por vía intraperitoneal, intravenosa o subcutánea, que permite una distribución homogénea en los capilares sanguíneos cerebrales. Los animales utilizados en este método no se anestesian, de manera que se puede analizar su actividad motora (68) .

#### 2.4.5. MODELO DE INFUSION INTRAVENOSO DE PENTILENTETRAZOL

El pentilentetrazol es un fármaco convulsionante que actúa en el Sistema Nervioso Central de los mamíferos, estimulando la corteza cerebral (2,15). La actividad convulsiva se debe a su capacidad para antagonizar la inhibición postsináptica mediada por GABA, disminuyendo por tanto la conductancia al cloruro (2,77).

La administración del pentilentetrazol por vía endovenosa provoca una actividad convulsiva de la siguiente manera (70):

- a) El animal presenta en forma aislada una o más contracciones nerviosas ("jerks").
- b) Continúa una convulsión clónica generalizada.
- c) Por último se presenta una convulsión tónico-clónica (convulsión persistente).



En esta prueba el fármaco candidato es administrado, y al tiempo de su máximo efecto, el pentilentetrazol se inyecta en la vena caudal de ratón como una infusión continua y a velocidad constante, hasta que se produzca la crisis convulsiva, registrándose el tiempo de infusión, para posteriormente determinar la protección proporcionada por el fármaco anticonvulsionante (35,70).

La dosis de pentilentetrazol puede ser determinada en un solo animal, en el cual la elevación de esta última en presencia del fármaco antiepiléptico proporciona una medida continua del efecto (35).

Es importante señalar que el pentilentetrazol es una de las sustancias que se utilizan sistemáticamente en la primera fase de la valoración de compuestos con posible efecto anticonvulsionante (68).

## 2.5. APLICACION DE LOS MODELOS EXPERIMENTALES DE EPILEPSIA

Muchas especies de animales de laboratorio han sido sometidas a una amplia variedad de estímulos eléctricos, químicos o sensoriales que desencadenan crisis epilépticas, con el fin de encontrar el o los modelos que semejen los diferentes tipos de epilepsia que presenta el humano (71), de tal forma que si al administrar al animal un fármaco capaz de controlarle las convulsiones inducidas experimentalmente, surja la posibilidad de aplicarse al ser humano para controlar sus crisis convulsivas (25).

Los procedimientos utilizados para detectar, cuantificar y evaluar un fármaco antiepiléptico, deben incluir pruebas que identifiquen si el anticonvulsionante eleva el umbral durante la crisis o si suprime la difusión de la actividad eléctrica anormal. Así mismo, evaluar si produce neurotoxicidad para lo cual se utiliza el modelo del rotarod (71). Para determinar si el uso prolongado del fármaco provoca un cambio en la actividad anticonvulsionante, que indica un desarrollo de tolerancia hacia su propia acción, se llevan a cabo estudios de toxicidad crónica (41,71).

Los mecanismos por los cuales el anticonvulsionante ejerce su acción también pueden ser conocidos mediante pruebas que utilizan sustancias que ya se conoce dónde ejercen su acción, como son la bicuculina, picrotoxina y estriocnina (68).

Por lo anterior, estos modelos tienen las siguientes aplicaciones (68):

- Evaluar la eficacia y seguridad de fármacos anticonvulsionantes.
- Estudiar los mecanismos implicados en la generación y autosupresión de las crisis epilépticas.
- Estudiar los mecanismos que se relacionan con la regulación de la excitabilidad en el Sistema Nervioso Central y de la actividad motora.

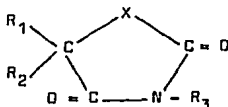
## 2.6. FARMACOS ANTIEPILEPTICOS

Antes de que se descubrieran los fármacos antiepilépticos el tratamiento de la epilepsia consistía en trepanación y aplicación de extractos animales y vegetales (57). En el siglo XVII se utilizaban purgantes y fomentos para liberar al cuerpo de una posesión demoniaca que provocaba las crisis (8).

En siglo XVIII se consideró que la epilepsia dependía de excesos sexuales, recomendándose la castración a los varones epilépticos como tratamiento (8).

En el año de 1857, Sir Charles Locock empleó el bromuro de potasio en pacientes epilépticos, obteniendo buenos resultados (8). Uno de los adelantos más importantes en el tratamiento de este padecimiento, tuvo lugar en 1912 con el descubrimiento de la eficacia del fenobarbital como antiepiléptico. A partir de entonces, una serie de investigaciones condujo al desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la epilepsia (40).

En la actualidad los medicamentos antiepilépticos se han clasificado en grupos químicos que tienen una estructura heterocíclica semejante con diversos substituyentes (25,57):

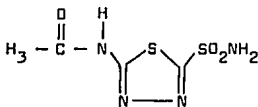


En los que la "X" varía de acuerdo al grupo de la siguiente manera (57):

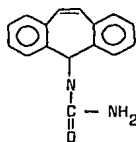
- |                     |                     |
|---------------------|---------------------|
| - Barbitúricos:     | - CO - NH -         |
| - Hidantofnas:      | - NH -              |
| - Oxazolidindionas: | - O -               |
| - Succinimidas:     | - CH <sub>2</sub> - |
| - Acetilureas:      | - NH <sub>2</sub>   |

Los sustituyentes  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  son grupos hidrofóbicos como: hidrógeno, metilo, etilo, fenilo, sec-butilo, halógeno, alilo, bencilo, feniletilo y metoximetileno (9).

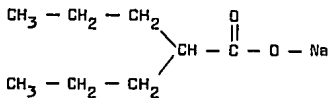
Además de los grupos mencionados se utilizan la carbamazepina, la acetazolamida, el ácido valproico y las benzodiazepinas, las cuales son estructuralmente distintas entre sí (25):



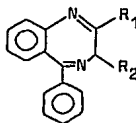
Acetazolamida



Carbamazepina



Valproato de sodio



Benzodiazepinas

Los medicamentos utilizados en este padecimiento deben tener la capacidad de controlar las crisis epilépticas, pero a menudo inducen efectos secundarios, por lo que es importante seleccionar el fármaco o la combinación de ellos que resulte más adecuada. De aquí que el fármaco antiepiléptico ideal sería aquel que suprimiera todas las crisis sin causar ningún efecto secundario en los pacientes (59).

#### 2.6.1. MECANISMO DE ACCION DE FARMACOS ANTIEPILEPTICOS

Los fármacos antiepilépticos pueden abolir o atenuar las crisis por acción a nivel del foco epiléptico, mediante dos mecanismos generales (59):

- a) A través de efectos sobre las neuronas alteradas de los focos de crisis que previenen o disminuyen su descarga excesiva.
- b) A través de efectos que reducen la propagación de la excitación desde los focos de crisis y previenen la detonación y la interrupción de la función de neuronas normales.

En la mayoría de los fármacos antiepilépticos, el efecto se consigue impidiendo la propagación de la actividad anormal hacia el tejido nervioso normal (32).

También se han considerado los sistemas de tipo inhibidor del Sistema Nervioso, como los mediados por el ácido gamma amino butírico (GABA), donde los barbitúricos y benzodiazepinas tienen una acción importante (32).

Así mismo, se ha observado que el calcio desempeña un papel importante en la excitabilidad neuronal, por lo que una regulación del mismo tendría una acción anticonvulsionante, como en las benzodiazepinas, fenitoina y barbitúricos que pueden regular la entrada de calcio en neuronas aisladas. En base a lo anterior, se puede decir que las sustancias anticonvulsionantes modulan procesos bioquímicos y electrofisiológicos (19).

#### 2.6.2. IMPORTANCIA DEL ACIDO GAMMA AMINO BUTIRICO (GABA) EN LA GENERACION DEL PROCESO EPILEPTICO

El ácido gamma aminobutírico (GABA) es un neurotransmisor inhibitorio ampliamente distribuido en el Sistema Nervioso, tanto de vertebrados como de invertebrados (13).

En los mamíferos el GABA se encuentra en altas concentraciones en cerebro y médula espinal, principalmente en la fracción soluble celular y en las terminales nerviosas (13,64). Es un neurotransmisor que no atraviesa la barrera hematoencefálica, por lo que una administración sistémica del mismo no sería eficaz para aumentar su concentración cerebral (13,75).

La mayor proporción de GABA proviene de la actividad de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD). Esta enzima cataliza la descarboxilación del ácido glutámico y utiliza como coenzima el fosfato de piridoxal. En los mamíferos esta enzima (GAD) se ha encontrado en la fracción sinaptosómica, y su localización en el cerebro se correlaciona bastante bien con el contenido del neurotransmisor GABA (24,64,75).

El sistema enzimático encargado de llevar a cabo el catabolismo del GABA se encuentra en la mitocondria y está estrechamente ligado al ciclo de Krebs. El GABA, a través de la GABA-transaminasa (GABA-T), que es también dependiente del fosfato de piridoxal, se transforma a semialdehído succínico, que es un intermediario del ciclo de Krebs (64,75).

El GABA se libera de terminales sinápticas reconocidas como inhibitoras, esta liberación es un proceso calcio-dependiente inhibido por los iones magnesio y por inhibidores del influjo de calcio, como son el verapamil y rojo de rutenio (64,75).

Al interactuar el GABA con su receptor postsináptico, induce una disminución en la excitabilidad de la neurona receptora, cambiando la permeabilidad de la membrana a los iones inorgánicos, principalmente a los cloruros. Este cambio en la permeabilidad al cloruro ocasiona una hiperpolarización de la neurona receptora, llamada inhibición postsináptica (13).

Este efecto hiperpolarizante es dependiente de la entrada de cloruro, por lo que se supone que el receptor de GABA está acoplado a un canal de cloro en la membrana postsináptica, que se activa cuando el receptor se une a su transmisor (64). Algunos de estos receptores están acoplados a los sitios de unión de las benzodiazepinas, lo que permite interacciones de tipo modulador entre el GABA y los ligandos de las benzodiazepinas, así como con los barbitúricos (19,55).

Un cambio en la acción postsináptica del GABA tiene efectos sobre la excitabilidad neuronal, por lo que la inhibición mediada por GABA y su relación con la epilepsia ha sido objeto de numerosas investigaciones (64).

En pacientes epilépticos y en animales tratados con distintos convulsionantes, se ha encontrado que la concentración de GABA esta disminuída en los tejidos involucrados en el foco epiléptico (15,61).

Los medicamentos pueden influir con la función GABAérgica al interaccionar con sitios pre y postsinápticos, modificando la cantidad de GABA que interactúa con los receptores postsinápticos, ya sea a nivel de síntesis, degradación o recaptación neuronal (13).

La modificación de los niveles de GABA observada en los procesos convulsivos podría estar relacionada con varios eventos (64):

- Disminución en la actividad de la enzima que lo sintetiza.
- Incremento en los mecanismos de liberación.
- Disminución en la acumulación desde el medio extracelular.
- Aumento en su degradación.

Sin embargo, las evidencias experimentales señalan que el factor determinante en la disminución del GABA es el decremento de la actividad de la glutamato descarboxilasa (GAD), que influye en la concentración de GABA sintetizado (24,64).

La GABA transaminasa (GABA-T) se encuentra en las mitocondrias, y el disminuir su actividad aumentaría los niveles de GABA en zonas extrasinápticas y no accesibles a las pozas de liberación que estarían disminuídas en la terminal nerviosa, por lo que una disminución del GABA accesible para la transmisión nerviosa estaría ligada al mecanismo de producción de convulsiones por algunos compuestos (64).

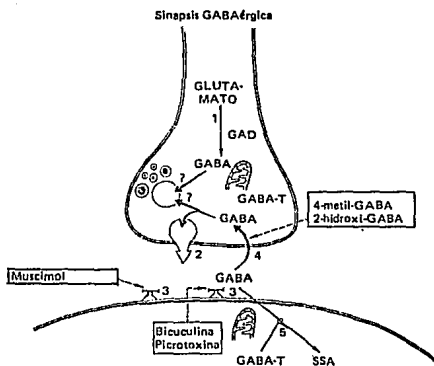


El bloqueo de los receptores postsinápticos del GABA por medio de sus antagonistas, como son la bicuculina y la picrotoxina, provoca convulsiones en los animales de experimentación (13,50,75).

La inactivación de GABA o su desaparición de la zona del receptor tiene lugar por dos mecanismos (75):

- Incorporación a la terminal nerviosa por un mecanismo de transporte activo, que es un proceso sodio-dependiente.
- Inactivación enzimática realizada por la enzima GABA-transaminasa y la succinosemialdehído deshidrogenasa.

Dado que los sistemas GABAérgicos se encuentran alterados en los procesos convulsivos inducidos de manera experimental, se han hecho investigaciones sobre el diseño de compuestos que modifiquen alguna etapa de la transmisión nerviosa mediada por GABA, con la finalidad de que presenten propiedades anticonvulsionantes y por tanto aumenten la concentración de GABA en los sitios donde es funcional como neurotransmisor (9,64).



- Sitio 1:** Síntesis enzimática: Descarboxilasa del ácido glutámico.
- Sitio 2:** Liberación: La liberación del GABA es un proceso calcio-dependiente.
- Sitio 3:** Interacción con receptores postsinápticos: La bicuculina y la picrotoxina bloquean la acción del GABA en estos receptores. El muscimol, agonista del GABA actúa en estos receptores postsinápticos.
- Sitio 4:** Recaptación: En el cerebro, el GABA es captado en las terminaciones presinápticas por un mecanismo sodio-dependiente. Los compuestos 4-metil-GABA y 2-hidroxi-GABA inhiben este mecanismo de captación.
- Sitio 5:** Metabolismo: El GABA es metabolizado por una transaminación por la GABA-transaminasa (GABA-T), localizada en las mitocondrias.

### 2.6.3. FARMACOS ANTIEPILEPTICOS CLASICOS Y SU RELACION CON LA TOLERANCIA FARMACOLOGICA

a) Fenobarbital (Barbitúrico).

A dosis terapéuticas impide la propagación de la descarga anormal, aumenta los efectos inhibitorios mediados por GABA, aumentando la conductancia al cloro e hiperpolarizando la membrana (29,59).

Es un inductor enzimático y con el tratamiento prolongado se desarrolla tolerancia, así como sedación; una supresión brusca del mismo provoca hiperexcitabilidad (26,47,59).

b) Difenilhidantoína (Hidantofna).

Este fármaco facilita los mecanismos de inhibición neuronal mediados por la conductancia al cloro, promueve la salida de  $Na^+$  de las neuronas, dificulta la despolarización propagada, aumenta las concentraciones de GABA cerebrales y es un inductor enzimático capaz de inducir el metabolismo de otros fármacos (32,57).

c) Trimetadiona (Oxazolidindiona).

Su acción se debe a la inhibición pre y postsináptica de los procesos que utilizan GABA como neurotransmisor (57). En modelos experimentales como el "kindling" se ha observado que produce tolerancia (39).

d) Etosuccimida (Succimida).

Actúa aumentando la conductancia al cloro, incrementando la inhibición postsináptica y los niveles cerebrales de GABA (47). En el modelo experimental de "kindling" no presentó señales de desarrollo de tolerancia ni signos de abstinencia (76).

e) Carbamazepina.

Disminuye la conductancia al sodio y en menor grado al potasio, no influye en la captación del GABA (47,57). Es un inductor de enzimas microsomales y se desarrolla cierta tolerancia a sus efectos neurotóxicos, que disminuyen al aumentar la dosificación (42,46,57).

f) Acetazolamida.

Su acción principal consiste en la inhibición de la anhidrasa carbónica, deshidratando los fosfolípidos de la membrana celular, por lo que aumenta el CO<sub>2</sub> en el cerebro y ejerce su actividad antiepiléptica (32,57). Su utilidad está limitada por el rápido desarrollo de tolerancia a su efecto anticonvulsionante (3).

g) Acido Valproico.

Tiene una acción sobre la inhibición postsináptica mediada por GABA, debido a que inhibe a la transaminasa del GABA, bloqueando su conversión a semialdehído succínico, aumentando por tanto los niveles de este neurotransmisor (8,32,57). En modelos experimentales se ha observado que en administraciones prolongadas provoca tolerancia a su efecto anticonvulsionante (46,76).

h) Benzodiazepinas.

Se ha propuesto que estos medicamentos ejercen su acción en el sistema GABAérgico, estabilizando la excitabilidad de la neurona (19). Dos aspectos importantes se consideran en su administración, uno es el efecto sedante que producen y el segundo es el desarrollo de tolerancia (27,34,65,66), observado en el tratamiento prolongado y donde la mejoría del paciente se ve disminuída (40,57).

## 2.6.4 CUANTIFICACION DE FARMACOS ANTIEPILEPTICOS

El desarrollo de técnicas para cuantificar concentraciones de fármacos en suero han sido un importante avance en el tratamiento de las enfermedades epilépticas (60). La utilidad de esta medición tanto en plasma como en otros fluidos biológicos es la de proporcionar un buen índice de los efectos del fármaco (22).

La cuantificación del fármaco en los diferentes fluidos biológicos involucra dos factores (22):

- Separar el fármaco de todas las sustancias de la muestra.
- Determinar la cantidad de fármaco separado.

En la práctica, los aparatos utilizados para este fin efectúan los dos procesos al mismo tiempo. Uno de los métodos utilizados es la cromatografía de gases, en la cual se lleva a cabo la separación y cuantificación de las diferentes sustancias que se introducen a su sistema (22).

En este método la sustancia tiene que ser volátil y termoestable, o que por manipulación química sea convertida a un derivado volátil y termoestable (73).

### 2.6.4.1. CROMATOGRAFIA DE GASES

La cromatografía es un método físico de separación que se basa en la distribución de la muestra en dos fases. Una de ellas es la fase estacionaria que puede ser un sólido o una película líquida que recubre a un sólido. La otra es la fase móvil que consiste en un gas o un líquido que circula sobre la fase estacionaria (69).

En la cromatografía de gases, la fase estacionaria es una substancia absorbente o adsorbente que se encuentra dentro de una columna; la fase móvil, es un gas inerte llamado gas portador, siendo los más utilizados el helio, hidrógeno, nitrógeno y argón (49).

- Las partes básicas de un cromatógrafo de gases son (49):
- Cilindro de gas portador.
  - Controlador de flujo.
  - Regulador de presión.
  - Cámara de Inyección.
  - Columna.
  - Horno.
  - Detector.
  - Registrador gráfico.

El gas portador, fluye continuamente a través del inyector, de la columna y del detector. Su finalidad, es la de transportar los componentes de la muestra a través de la columna. El gas debe ser inerte y no reaccionar ni con la muestra ni con la fase estacionaria (49). Es importante que sea de alta pureza, ya que las impurezas pueden alterar los tiempos de retención de la muestra (69). La medición y el control de flujo del gas portador son importantes para la eficiencia de la columna (49).

La entrada de la muestra debe permitir la introducción de una amplia variedad de muestras, incluyendo gases y líquidos; se trata de una cámara situada a la entrada de la columna y calentada independientemente a ésta, que suele tener una membrana a través de la cual se introduce la muestra con una microjeringa. (69).

Los componentes de la muestra se desplazan dentro de la columna, que es un tubo largo de metal o de vidrio relleno apretadamente de partículas sólidas, con una longitud que oscila entre 1-200 m, con un diámetro interior desde 0.1-50 mm, según el tipo de columna; la elección de la columna permite el desplazamiento adecuado de los componentes de la muestra a velocidades diferentes, lo que hace posible su separación e identificación (73).

La columna se encuentra dentro de un horno, el cual genera la temperatura adecuada para que se lleve a cabo el procedimiento cromatográfico (69) y para que la separación pueda efectuarse a una temperatura reproducible. El control de la temperatura de la columna es eficaz para promover la separación (49).

El detector cromatográfico es un dispositivo que mide la concentración de cada uno de los componentes de la muestra y genera una señal eléctrica proporcional a la concentración, (67).

Los detectores utilizados en la cromatografía de gases son (49,69):

- Conductividad térmica.
- Detector de ionización de flama.
- Detector de captura de electrones.
- Detector de nitrógeno-fosforo.
- Detector fotométrico de flama.
- Detector infrarrojo.
- Detector de espectrometría de masas.

En particular, el detector de ionización de flama se basa en el principio de que la conductividad eléctrica de un gas es directamente proporcional a la concentración de las partículas cargadas dentro del gas. El gas portador fluye desde la columna hasta la llama, la cual ioniza algunas de las moléculas orgánicas presentes en la corriente gaseosa (67).

La presencia de partículas cargadas (iones positivos, iones negativos y electrones) en el espacio entre los electrodos, origina una corriente que fluye en esta área y a través de una resistencia que las mide (49). Cuando un componente orgánico entra en la llama y se quema, se forman partículas cargadas, cuyo aumento provoca un flujo de corriente, la cual produce una señal que es amplificada y dibujada como un pico sobre el registrador gráfico. Este tipo de detector utiliza helio o nitrógeno como gas portador (67).

En este tipo de detector, el hidrógeno y el gas portador se mezclan entre sí y se queman formando la llama. El aire pasa a través de la base del detector para mantener la llama encendida; también puede usarse oxígeno en vez de aire. Cerca de la salida de los gases se coloca una bobina de ignición para facilitar la combustión (49).

El detector de ionización de flama responde a los compuestos orgánicos, entre las sustancias que no dan respuesta se encuentran el aire, el agua, los gases inertes, monóxido de carbono, bióxido de carbono, disulfuro de carbono, bióxido de azufre y el ácido sulfhídrico. Por no responder al aire y al agua, este detector es útil para el análisis de trazas de materia orgánica en el aire, en el agua o en muestras acuosas, tales como bebidas alcohólicas o muestras biológicas (49,69).



El registrador de la señal es un aparato de medida eléctrica que transforma la señal en un desplazamiento de una plumilla que graba sobre una banda de papel. Este desplazamiento es transversal, es decir, perpendicular a la dirección de avance de la banda de papel, y su magnitud depende de la intensidad de la señal que lo origina. La banda de papel avanza longitudinalmente, siendo esta dirección un registro en base al tiempo; la dirección transversal del registro, indica la intensidad de la señal, y el conjunto de ambas genera el llamado cromatograma (69).

El cromatograma, es el registro gráfico del análisis, donde se indican los componentes y el grado de concentración en que estaban presentes, dibujándose su perfil de concentración para obtener dos parámetros importantes (49): el tiempo de retención y área del pico.

El área del pico permite determinar la concentración de cada componente de la muestra (73). El tiempo de retención es el tiempo que transcurre desde que se inyecta la muestra hasta que se obtiene el máximo del pico. Este tiempo es característico del soluto, la fase líquida y de la temperatura de la columna (49).

En el análisis cromatográfico, se puede utilizar una temperatura isotérmica o una temperatura programada. La primera se refiere al uso de una sola temperatura durante el análisis, en cambio, en la segunda se efectúa un aumento lineal de la temperatura de la columna con el tiempo, lo cual permite un rápido calentamiento y enfriamiento del horno de la columna, así como un tiempo de análisis más breve que la operación isotérmica (49,69,73).

El uso de una temperatura programada durante el análisis se utiliza para facilitar y acelerar la separación, la identificación y determinación de los componentes de la muestra. Se utiliza una temperatura inicial baja y así los primeros picos aparecen bien resueltos; a medida que aumenta la temperatura, cada componente de mayor índice de vaporización es eluido hacia afuera de la columna por la temperatura ascendente (49,73). Esta programación permite seleccionar la temperatura más adecuada para dar picos bien resueltos y definidos (49). El detector de llama, es apropiado para trabajos de temperaturas programadas elevadas, ya que es insensible a pequeños cambios de temperatura (69).

## 2.7. TOLERANCIA

Con frecuencia se utilizan fármacos que actúan en el Sistema Nervioso sin considerar posibles efectos que puedan alterar su acción, como son la tolerancia y dependencia física hacia el medicamento (29).

La mayoría de fármacos antiepilépticos se administran durante períodos prolongados y en muchos casos en combinación con otros medicamentos, estos dos factores son importantes para determinar si se altera la potencia anticonvulsionante, así como los mecanismos farmacocinéticos y/o farmacodinámicos que intervienen en la modificación de la respuesta (72).

La tolerancia es un estado en el cual la capacidad de un organismo para reaccionar frente a una dosis específica de fármaco se ha visto disminuída, es decir, su respuesta ha sido menor que la que presentó anteriormente para la misma dosis, siendo necesario aumentar la dosis para mantener el efecto farmacológico inicial (5,43).

Este fenómeno de tolerancia se presenta para una gran cantidad de fármacos y sustancias exógenas que ingiere el hombre, como pueden ser el cigarro, el alcohol, los narcóticos, los sedantes-hipnóticos, anticonvulsionantes y en general, aquellos que actúan sobre el Sistema Nervioso Central (29,43). Se ha observado que los fármacos que actúan sobre el Sistema Nervioso, provocan una conducta compulsiva que obliga a la autoadministración. Cuando dicha sustancia se deja de administrar se produce un cuadro de abstinencia, con un desequilibrio fisiológico y alteraciones físicas de importancia. Este estado es el que se conoce como dependencia física (29,43).

La dependencia física es un estado que se asocia frecuentemente con la tolerancia a un fármaco, pero no necesariamente se presentan al mismo tiempo. En la dependencia física, los efectos de privación desaparecen al readministrar el fármaco; en el caso de la tolerancia existe un cambio cuantitativo de la respuesta hacia el fármaco, que se reestablece al ir aumentando la dosis hasta obtener la respuesta original al mismo (29,43).

### 2.7.1. TIPOS DE TOLERANCIA

Las variaciones cuantitativas en la respuesta a un fármaco se presentan con frecuencia, provocando modificaciones en la intensidad del efecto, como ocurre en la tolerancia, en la cual la efectividad del medicamento se ve disminuida como consecuencia de la administración continua del mismo (7).

En el desarrollo de tolerancia hacia los efectos de un fármaco pueden intervenir varios tipos de fenómenos, como los que a continuación se mencionan:

- Cuando la tolerancia se desarrolla de forma rápida (horas) después de una sola administración, se llama tolerancia aguda o taquifilaxis (20).
- Si el fármaco se administra durante un período de tiempo prolongado e induce tolerancia, se nombra tolerancia crónica (20,43).
- La tolerancia cruzada se presenta cuando la tolerancia desarrollada para algunos fármacos, también la causa para otros medicamentos relacionados farmacológicamente (5,14).
- Otro tipo de tolerancia ocurre cuando la respuesta inicial se ve disminuida y es reemplazada por otra respuesta, un ejemplo es la morfina que al principio causa euforia y después letargo (20).
- La tolerancia de especie se presenta en una especie animal particular que tiene una determinada insensibilidad a un compuesto, como los conejos que por la presencia de una atropinasa son insensibles a la atropina (8,74).
- La tolerancia individual se presenta en determinados miembros de una especie, ya que cada organismo puede responder de una manera distinta al mismo fármaco debido a una variabilidad individual, por ejemplo, unos conejos serán más resistentes que otros a la atropina (7,8).
- La tolerancia adquirida o de adaptación se presenta en microorganismos patógenos hacia agentes quimioterapéuticos, como es la resistencia a la acción bactericida de la penicilina por secreción de una enzima que la destruye (8,74).

La tolerancia no se desarrolla por igual para todos los efectos de un fármaco, existiendo casos donde se desarrolla tolerancia a los efectos indeseables del fármaco, como ocurre con la tolerancia a la sedación que produce el fenobarbital cuando se utiliza como anticonvulsionante (36).

## 2.7.2. MECANISMOS DE TOLERANCIA

Estos mecanismos se pueden dividir en dos grupos (29):

- 1) Por medios indirectos.
- 2) Por efectos en los sitios de acción.

Por mecanismos indirectos, existen dos formas mediante las cuales un organismo se puede hacer tolerante:

- a) Al aumentar la dosis del fármaco, la concentración del fármaco libre que está en contacto con los receptores se encuentra aún dentro de los límites normales. Esto se puede deber a una disminución en la absorción, aumento en la velocidad de eliminación, disminución en su paso a través de membranas, aumento en su fijación para ser complejo inerte o aumento en su metabolismo (29).

Dentro de este grupo, uno de los mecanismos generales es la alteración en el grado de degradación bioquímica, que involucra un aumento en la síntesis de enzimas microsomiales que metabolizan a los fármacos (20). La tolerancia desarrollada en este caso se denomina tolerancia metabólica o farmacocinética, desarrollándose en fármacos capaces de inducir su propio metabolismo como los barbitúricos. Esta biotransformación aumentada limita la duración e intensidad del efecto deseado y para obtener nuevamente el efecto es necesario aumentar la dosis o la frecuencia de administración del medicamento (14,36).

- b) El segundo mecanismo indirecto involucra mecanismos homeostáticos por los cuales el organismo puede antagonizar los efectos del fármaco (29). Estos cambios homeostáticos se presentan porque el fármaco altera algún punto de la homeostasis y provoca un cambio en el sistema de restauración, que desaparece cuando el organismo ha alcanzado un nuevo estado de equilibrio (20,29,52).

El mecanismo que explica la tolerancia a través de los sitios de acción de los receptores del fármaco, indica que se presentan cambios en los mecanismos celulares de acción, en los que se puede presentar (7,8,36,58):

- Un cambio en las propiedades del receptor que lo haga menos sensible al fármaco.
- Un cambio en el número de receptores.
- Una disociación lenta del fármaco de su receptor, el cual al no encontrarse en una concentración libre suficiente no podrá unirse al fármaco administrado, provocando una disminución en la efectividad del mismo.

Este tipo de tolerancia se denomina tolerancia celular o farmacodinámica (36,58).

Con lo anteriormente expuesto, se puede observar que el organismo tiene muchos mecanismos que le permiten adaptarse a los diversos efectos de un fármaco y por lo tanto provocar tolerancia, por ello el grado de tolerancia puede variar dentro de límites muy amplios (20,29).

## 2.8. IMPORTANCIA DE LOS ESTUDIOS PRECLINICOS DE FARMACOS EN DESARROLLO

Durante el desarrollo de un fármaco, si se ha sintetizado tanto una nueva molécula, como obtenido un principio activo, debe estudiarse su eficacia farmacológica en animales de laboratorio u otros modelos experimentales. Una vez comprobada ampliamente su eficacia debe someterse a diferentes pruebas toxicológicas, cuyo fin es probar la seguridad de que no produce efectos nocivos (6).

La información que proporcionan los estudios de toxicidad es la producción de algún efecto tóxico, evaluándolo para predecir su posible aparición cuando se administre al hombre, y por tanto, prevenir los efectos indeseables (6).

Las pruebas utilizadas en los estudios toxicológicos son (38):

- Toxicidad aguda.
- Toxicidad subaguda.
- Toxicidad crónica.
- Efectos sobre las funciones de reproducción.
- Carcinogénesis y mutagénesis.

La toxicidad aguda estudia los efectos adversos que se presentan dentro de un corto período de tiempo después de la administración única o dosis múltiples dadas dentro de un lapso de 24 horas (18).

La mayoría de los medicamentos no se administran una sola vez, sino se emplean por períodos prolongados, por lo que para detectar los efectos en animales, deben administrarse en plazos prolongados en dosis repetidas, observando que pueden afectar un órgano blanco, producir fenómenos de acumulación y alteración de sistemas enzimáticos, tales como inducción enzimática, fenómenos de tolerancia y adicción (6). Este tipo de pruebas comprenden los estudios de toxicidad subaguda y crónica. En la primera, la administración del fármaco se efectúa durante un lapso que no exceda el 10% de la vida del animal. En el segundo, el fármaco se administra durante 2/3 partes de la vida del mismo. La duración de los estudios anteriores depende del tiempo de administración que se pretende en el hombre (18).

La administración de sustancias químicas a un organismo puede ocasionar daños en su sistema reproductivo o neuroendócrino, provocando incapacidad para concebir normalmente, infertilidad, abortos, malformaciones en los productos y alteraciones en la conducta de la descendencia. De esta forma, la toxicología de la reproducción proporciona información acerca del daño que puede causar un compuesto si el órgano blanco es el aparato reproductor (21).

Si la administración de una sustancia provoca la inducción de alteraciones en el genoma, tanto en células somáticas como germinales, se dice que es un mutágeno. Las mutaciones somáticas en un organismo en desarrollo provocan una diferenciación anormal de las células, mientras que en un adulto puede ocasionar cáncer. Las alteraciones en las células germinales son importantes porque se transmiten a generaciones sucesivas, al contrario de las alteraciones en las células somáticas que son propias del individuo. Por tanto, los estudios de mutagénesis son los que determinan este tipo de alteraciones genéticas (43).



Las pruebas carcinogénicas evalúan la capacidad de una sustancia para producir cáncer o inducir la formación de tumores, tanto benignos como malignos, para determinar la incidencia de éstos (6,43).

De acuerdo a lo mencionado, las sustancias químicas que están en contacto con el hombre son capaces de causarle algún daño, ya sea a nivel fisiológico o bioquímico, sobre todo si se ha estado en contacto con él durante un período prolongado de tiempo, por tal razón, un fármaco en desarrollo debe someterse a estudios de eficacia y seguridad, para evaluar los resultados y así poder predecir su posible administración al hombre (6,53).

## 2.9. FARMACOS ANTIEPILEPTICOS SINTETIZADOS EN MEXICO

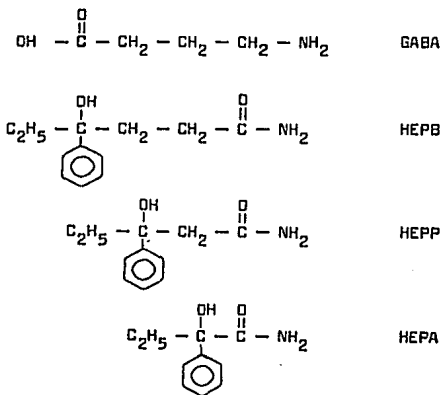
En los estados convulsivos se ha observado que la concentración del neurotransmisor GABA se encuentra disminuída y que esta disminución implica un aumento en las convulsiones, lo que llevó a establecer que si se inhibía la enzima que cataboliza al GABA (transaminasa del GABA), los niveles de este aminoácido inhibitor aumentarían y se obtendría un efecto anticonvulsionante (11).

En base a lo anterior, en 1964, Carvajal (11) planeó el desarrollo de compuestos análogos del GABA con substituyentes en la posición gamma con la finalidad de inhibir a la transaminasa del GABA y de esta manera prolongar el efecto anticonvulsionante de este neurotransmisor. Así, se sintetizaron compuestos con substituyentes etilo y fenilo, (9). Estos compuestos sintetizados presentarían afinidad con los receptores del GABA y serían capaces de unirse con la transaminasa por su gran parecido al substrato normal, aumentando de esta forma los niveles de GABA (61).

Los compuestos sintetizados fueron metil fenil pirrolidinona (MPP), etil fenil pirrolidinona (EPP) y difenil pirrolidinona (DPP), pero con estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) y difracción de rayos X se determinó que la estructura que presentaban correspondía a la de una hidroxiamida acíclica, por lo que sus nombres cambiaron y se consideraron como derivados 4,4-disustituídos de la butiramida, designándose respectivamente como HMPB (4-hidroxi-4-metil-4-fenilbutiramida), HEPB (4-hidroxi-4-etil-4-fenilbutiramida) y HDPB (4-hidroxi-4,4-difenilbutiramida) (9,78).

De los compuestos sintetizados, la HEPB mostró tener mayor protección contra las convulsiones inducidas por tiosemicarbazida, pentilentetrazol y electrochoque (56). Por lo que se sintetizaron homólogos superiores e inferiores de esta butiramida trisustituída (HEPB) (51).

La estructura química del GABA, de la HEPB y sus homólogos inferiores es la siguiente (51):



## 2.10. ESTUDIOS FARMACOLOGICOS Y TOXICOLOGICOS DE LOS ANTICONVULSIONANTES SINTETIZADOS EN MEXICO

Los estudios del perfil anticonvulsivo y de neurotoxicidad, efectuados a HEPB, HEPP y HEPA demostraron amplia actividad anticonvulsionante contra electrochoque, pentilentetrazol, 4-aminopiridina, bicuculina y picrotoxina. En la prueba de neurotoxicidad, el más neurotóxico fue la HEPA y el menos neurotóxico fue la HEPP (51).

En cuanto al mecanismo de acción de los fármacos HEPB y HEPP los resultados indican que ambos anticonvulsionantes aumentan las corrientes de cloro activadas por GABA, lo que sugiere que actúan en sistemas GABAérgicos y de esta manera ejercen su acción anticonvulsionante (1).

Estos fármacos han sido sometidos a estudios toxicológicos en animales de laboratorio, para conocer su riesgo de utilización en humanos (16,17).

Con base a lo anterior, se investigó la probable toxicidad producida por la administración de la HEPB durante 90 días en ratón macho CD-1 (25-30 g), observándose que el fármaco fue bien tolerado hasta una dosis de 230 mg/kg, siendo tóxico a dosis de 350 mg/kg, produciendo muerte en el 50% de los animales tratados (17).

Los estudios teratogénicos de la HEPB en rata Wistar (200-250 g) determinaron que no existe teratogenicidad ni embriotoxicidad hasta una dosis de 200 mg/kg vía oral, administradas del día 6 al 15 de la gestación (16). Los estudios teratogénicos en ratón CD-1 (25-30 g) indicaron que ninguno de los tres fármacos produce teratogenicidad, administrados durante períodos similares hasta una dosis de 170 mg/kg (48).

En la evaluación de la genotoxicidad de los fármacos HEPP y HEPB en células somáticas de Drosophila melanogaster, ninguno de ellos produjo una frecuencia significativa de mutaciones, y en la prueba de Ames para los tres fármacos, ninguno mostró actividad mutagénica (23,37).

En estudios que evalúan alteraciones en la conducta, la HEPB se administró a madres gestantes, indicando los resultados una alteración del comportamiento de la madre en cuanto a la relación con su cría, aunque en estos últimos no se vió afectado su desarrollo funcional (44).

En estudios farmacocinéticos, efectuados en conejos, tratados crónicamente con HEPP, se presentó una disminución significativa en los valores de depuración del fármaco, lo que sugiere una posible tolerancia al efecto anticonvulsionante, (30).

Los estudios farmacocinéticos realizados en rata Wistar mostraron que el efecto anticonvulsionante del fármaco HEPP está relacionado en forma directa con sus concentraciones en cerebro y en suero, y que no se une en forma significativa a las proteínas plasmáticas (30).

En la transformación metabólica de los xenobióticos, los grupos fenílicos generalmente se hidroxilan en posición "para" y/o en "orto". Por lo anterior, el grupo de Carvajal ha planeado bloquear la posición "para" del grupo fenilo de la HEPP, para impedir y/o retrasar la inactivación del fármaco y conseguir un efecto más duradero del mismo, sintetizando dos nuevos compuestos fluorados, que son (10):

-la DL-3-hidroxi-3-etil-3-(p-fluorofenil)-propionamida

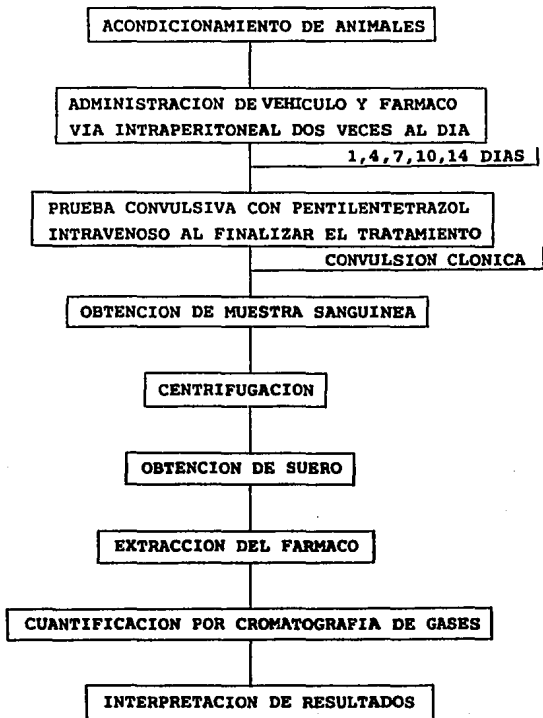
-la DL-3-hidroxi-3-metil-3-(p-fluorofenil)-propionamida

(DL-HEPP-pF) y (DL-HMPP-pF), respectivamente.

# CAPITULO III

## PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1. DIAGRAMA



### 3.2. MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO

#### 3.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Ratones macho de la cepa CD-1 con un peso de 25-40 g.

#### 3.2.2. MATERIAL DE LABORATORIO

- Matraces aforados de 5, 10, 50, 100 ml (PK).
- Tubos de microcentrifuga 11 x 38 mm.
- Tubos de centrifuga cónicos 10 x 150 mm (PK).
- Tubos de concentración 10 x 150 mm.
- Tubos de ensayo 16 x 100 ml (PYREX).
- Pipetas serológicas graduadas de 1, 5, 10 ml (PK).
- Pipetas Pasteur.
- Probeta graduada de 5 ml (PYREX).
- Vasos de precipitados 10, 100 ml (PYREX).
- Matraz Kitasato 500 ml (PYREX).
- Micropipetas de 5-50  $\mu$ l, 50-200  $\mu$ l, 200-1000  $\mu$ l.
- Jeringas Plastipak 1 ml.
- Papel Parafilm.
- Bombilla de hule.
- Espátula.
- Gradilla.

#### 3.2.3. EQUIPO

- Balanza analítica (Sauter).
- Balanza granataria (Mettler).
- Bomba de inyección (Harvard).
- Centrifuga (Solbat).
- Microcentrifuga (Beckman).
- Vortex Mixer (SP).

- Bomba de vacío (Felisa).
- Parrilla (Lindberg).
- Cromatógrafo de Gases Varian 4600, con columna OV-17, y detector de ionización de flama.
- Integrador Varian CDS 401.
- Cilindro con gas nitrógeno (AGA).
- Cilindro con gas hidrógeno (AGA).
- Cilindro con aire (AGA).

### 3.2.4. REACTIVOS

- Fármaco HEPB: 4-hidroxi-4-etil-4-fenilbutiramida.
- Fármaco HEPP: 3-hidroxi-3-etil-3-fenilpropionamida.
- Fármaco HEPA: 2-hidroxi-2-etil-2-fenilacetamida.
- Rivotril (Clonazepam 2.5 mg, Roche).
- Cloruro de metileno (Sigma).
- Hidróxido de sodio (J.T. Baker).
- Pentilentetrazol (Sigma).
- Acetonitrilo (Aldrich).
- Agua oxigenada (Lasa).
- Bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida: BSTFA (ICN).

#### 3.2.4.1. PREPARACION DE REACTIVOS

- 1) Solución de hidróxido de sodio 0.3 M.  
Se disolvió 1.2 g de NaOH y se aforaron a 100 ml con agua destilada.
- 2) Solución HEPA 1 µg/µl.  
Se pesaron 500 mg de HEPA, aforando a 50 ml con acetonitrilo.
- 3) Solución HEPP 1 µg/µl.  
Se disolvieron 50 mg de HEPP en acetonitrilo, aforando a 50 ml.



### 3.2.4.2. PREPARACION DE FARMACOS

1) Fármaco HEPB.

Se pesaron 100 mg de HEPB, disolviéndolo en 10 ml de agua destilada.

2) Fármaco HEPP.

Se pesó 100 mg de HEPP y se disolvió en 10 ml de agua destilada.

3) Fármaco Clonazepam.

De la presentación farmacéutica, se transfirió un volumen de 0.2 ml para disolverlo en 10 ml de agua destilada.

4) Agente convulsionante Pentilentetrazol (PTZ).

Se disolvieron 500 mg de pentilentetrazol en agua destilada aforando a 50 ml.

### 3.3. METODOLOGIA

#### 3.3.1. ACONDICIONAMIENTO DE ANIMALES

Se utilizaron 216 ratones macho CD-1 (peso de 25-30 g) que se colocaron en jaulas metálicas, con libre acceso a alimento y agua, en un cuarto con temperatura de  $22 \pm 1$  °C, una humedad relativa de 50-60 % y ciclos de luz/obscuridad de 12 horas cada uno.

### 3.3.2. TRATAMIENTO ANTICONVULSIVO (34)

Se distribuyeron los ratones aleatoriamente en 4 grupos, para la administración de los fármacos HEPP, HEPB y Clonazepam; el cuarto grupo fue el testigo, al cual se le administró el vehículo (agua destilada). Los fármacos y el vehículo se aplicaron por vía intraperitoneal (i.p.) dos veces al día (0800 y 1900 h). La dosis utilizada para el tratamiento anticonvulsivo fue de 0.5 mg/kg para el Clonazepam y de 100 mg/kg para la HEPB y HEPP.

Cada grupo se dividió en 6 subgrupos, asignando a cada uno un determinado período de tratamiento, que consistió en la administración del vehículo (agua destilada) y fármacos durante 1, 4, 7, 10 y 14 días.

En el último día de tratamiento la administración matutina del fármaco y vehículo se efectuó por vía subcutánea, y pasados 10 minutos se realizó la prueba convulsiva con el pentilentetrazol.

El subgrupo restante, se trató durante 14 días y al finalizar el tratamiento, la dosis administrada en la mañana por vía subcutánea fue el doble de la dosis normalmente recibida, transcurridos 10 minutos se llevó a cabo la prueba convulsiva.

### 3.3.3. PRUEBA CONVULSIVA

Se inyectó pentilentetrazol (PTZ) a una concentración de 10 mg/ml en la vena caudal del ratón, a una velocidad de 0.29 ml/min., hasta que se presentara una convulsión clónica. Al presentarse la crisis convulsiva, la administración del pentilentetrazol se detuvo, registrándose el tiempo transcurrido, para inmediatamente obtener muestras de sangre por punción ocular.

La mínima dosis convulsiva se obtuvo para cada ratón, calculándose también la media para cada grupo, expresando el resultado obtenido como protección en mg/kg de pentilentetrazol (mg/kg PTZ) administrado para provocar la convulsión en el ratón (34).

### 3.3.4. DETERMINACION DE HEPP EN PLASMA (31)

- 1) La muestra de sangre obtenida por punción ocular del ratón convulsionado se centrifugó a 2500 rpm durante 6 minutos para obtener el suero.
- 2) Se tomó una muestra de suero de 100  $\mu$ l, adicionando 5  $\mu$ l de HEPA (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) como estándar interno.
- 3) Se alcalinizó con 50  $\mu$ l de NaOH 0.3 M y agitando para homogeneizar.
- 4) El fármaco se extrajo con 5 ml de cloruro de metileno.
- 5) Se centrifugó a 2500 rpm/min durante 6 minutos.
- 6) La fase acuosa se separó de la orgánica mediante vacío.
- 7) La fase orgánica se transfirió a un tubo de concentración para que se evaporara.

- 8) Una vez evaporada, se adicionaron 50  $\mu$ l del agente derivatizante BSTFA [Bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida], tapando perfectamente el tubo de concentración con papel Parafilm, permitiendo una reacción de un mínimo de 4 horas para la inyección de la muestra en el cromatógrafo de gases.

#### 3.3.4.1. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Se utilizó un Cromatógrafo de Gases Varian 4600, con detector de ionización de flama y un integrador Varian CDS 401. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: temperatura del inyector: 200 °C, temperatura del detector: 240 °C, con una temperatura inicial en la columna de 160 °C (0.2 min.), con un incremento programado de 4 °C/min. hasta alcanzar una temperatura de 190 °C (5 minutos).

El gas acarreador (nitrógeno) fluía a 35 ml/min., el hidrógeno y el aire con un flujo de 35 y 300 ml/min., respectivamente.

# CAPITULO IV

## RESULTADOS

### 4.1 RESULTADOS

Se administraron los fármacos HEPP, HEPB, Clonazepam y el vehículo (agua destilada) a ratones macho CD-1, por vía intraperitoneal (i.p.) dos veces al día, con períodos de tratamiento de 1, 4, 7, 10 y 14 días, con el propósito de evaluar el desarrollo de tolerancia al efecto anticonvulsionante y su posible relación con la concentración plasmática del mismo.

Un grupo adicional se administró durante 14 días con la diferencia de que en el último día del tratamiento, la dosis administrada fue el doble de la normalmente recibida, con la finalidad de observar de que si se había desarrollado tolerancia, un incremento en la dosis, conduciría a un aumento en la protección ya disminuída

Los resultados obtenidos en cuanto a la protección (mg/kg PTZ) de todos los lotes utilizados se muestran en la Tabla I.

En el grupo testigo la mínima dosis convulsiva no presentó cambios significativos durante los diferentes días del tratamiento (Tabla I, Fig. I), encontrándose valores que oscilaron entre 50.3 y 55.0 mg/kg PTZ.

La HEPP provocó una disminución significativa en la protección contra el pentilentetrazol (PTZ), desde el cuarto día de la administración hasta el día catorce, con valores que oscilaron entre 84.0 y 87.6 mg/kg PTZ. Cuando se administraron 200 mg/kg el día 14 (14-D), la protección regresó a un valor de  $137.5 \pm 18.2$  mg/kg PTZ, que no difirió significativamente del correspondiente al primer día de administración que tuvo el valor de  $126.1 \pm 15.8$  mg/kg PTZ (Tabla I, Fig. II).

La HEPB no mostró disminución significativa en la protección contra el pentilentetrazol (PTZ), observándose valores entre 85.2 y 98.2 mg/kg PTZ, exceptuando el día catorce (dosis doble: 14-D), el cual se vió aumentado de forma significativa con un valor de  $196.3 \pm 20.2$  mg/kg PTZ, con respecto al primer día que tuvo un valor de  $85.2 \pm 10.7$  mg/kg PTZ (Tabla I, Fig. III).

El Clonazepam presentó diferencias significativas a los 4, 7 y 10 días de administración como sucedió con la HEPP, mostrando valores de :  $163.1 \pm 20.9$ ,  $185.7 \pm 18.5$  y  $173.4 \pm 19.9$  mg/kg PTZ, respectivamente, comparados con el valor de  $219.8 \pm 20.1$  del primer día. La administración de 14 días (dosis doble: 14-D), en cambio, aumentó a un valor de  $281.9 \pm 34.4$  mg/kg PTZ que representó un consumo superior de pentilentetrazol como en los períodos anteriores (Tabla I, Fig. IV).

La concentración plasmática de anticonvulsionante se determinó para un solo fármaco, la HEPP, observándose una disminución significativa en las muestras correspondientes a los tratamientos de 4,10 y 14 días (Tabla II, Fig. V). En la Fig. VI se muestra la relación de los valores obtenidos en el estudio de protección con los resultados de la concentración plasmática del fármaco HEPP.

DIAS TOTALES DE TRATAMIENTO	TESTIGO	HEPP (100 mg/kg)	HEPB (100 mg/kg)	CLONAZEPAM (0.5 mg/kg)
1	51.4 ± 9.9	126.1 ± 15.8	85.2 ± 10.7	219.8 ± 20.1
4	50.3 ± 9.8	84.0 ± 10.1 **	92.8 ± 16.5	163.1 ± 20.9 **
7	55.0 ± 4.1	86.9 ± 10.4 **	98.2 ± 13.3	185.7 ± 18.5 **
10	53.0 ± 5.6	85.8 ± 10.4 **	94.6 ± 14.1	173.4 ± 19.9 **
14	54.8 ± 5.8	87.6 ± 13.1 **	91.4 ± 15.8	211.0 ± 27.1
14-D	54.8 ± 5.8	137.5 ± 18.2	196.3 ± 20.2 **	281.9 ± 34.4 **

Tabla I. Pentilentetrazol (mg/kg) administrado para la producción de convulsiones clónicas en ratones tratados con distintos anticonvulsivos por vía i.p., 2 veces al día durante diferentes periodos de tratamiento.

14-D: Período de tratamiento de 14 días. El último día se administró el doble de la dosis de los anticonvulsivos (HEPP: 200 mg/kg, HEPB: 200 mg/kg, Clonazepam: 1.0 mg/kg).

Los valores representan la media ± d.s. (n=9).

\* p < 0.05; \*\* p < 0.01.



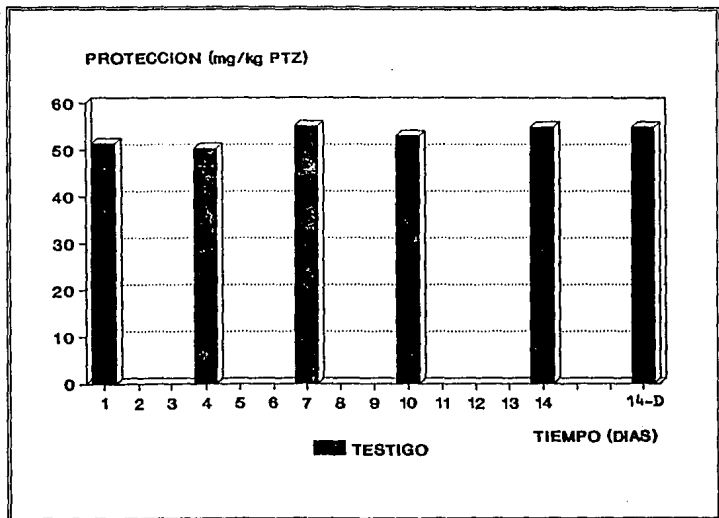


Fig. I. Pentilentetrazol (mg/kg) administrado para la producción de convulsiones clónicas en ratones tratados con el vehículo (agua destilada), por vía intraperitoneal 2 veces al día, durante diferentes periodos de tratamiento. 14-D: Período de tratamiento de 14 días.

\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

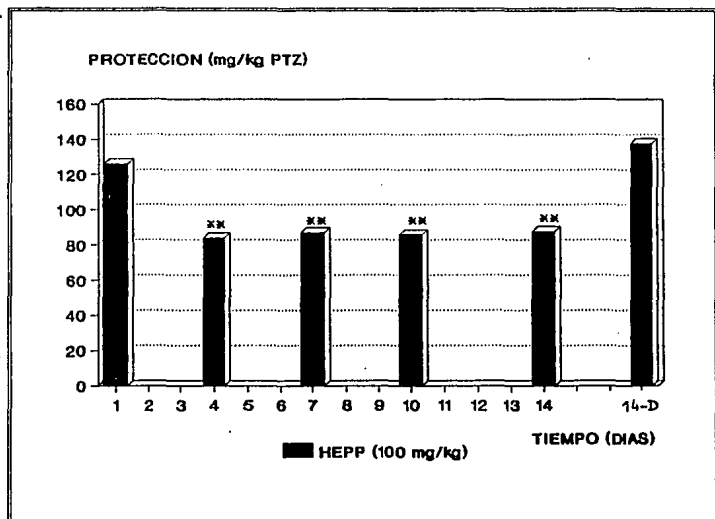


Fig.II. Pentilentetrazol (mg/kg) administrado para producir convulsiones clónicas en ratones tratados con el fármaco HEPP, vía i.p., 2 veces al día, durante diferentes tratamientos.

14-D: Período de tratamiento de 14 días. El último día se administró el doble de la dosis de HEPP (200 mg/kg).

\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

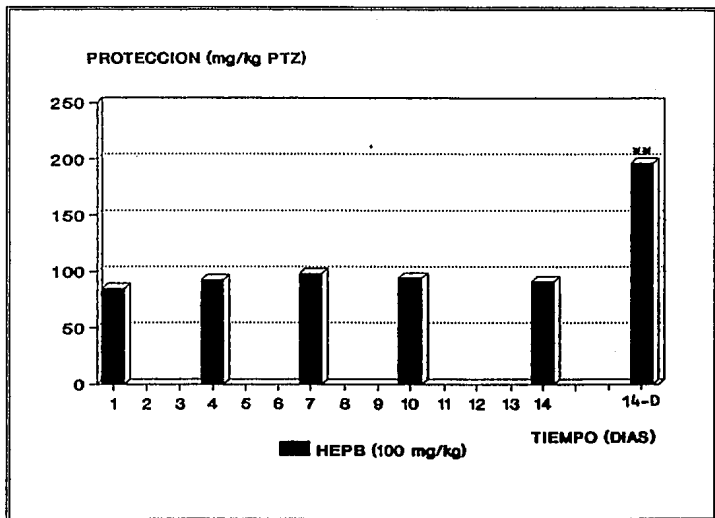


Fig.III. Pentilentetrazol (mg/kg) administrado para provocar convulsiones clónicas en ratones tratados con el fármaco HEPB, vía i.p., 2 veces al día, durante distintos días de tratamiento.

14-D: Período de tratamiento de 14 días. El último día se administró el doble de la dosis de la HEPB (200 mg/kg).

\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

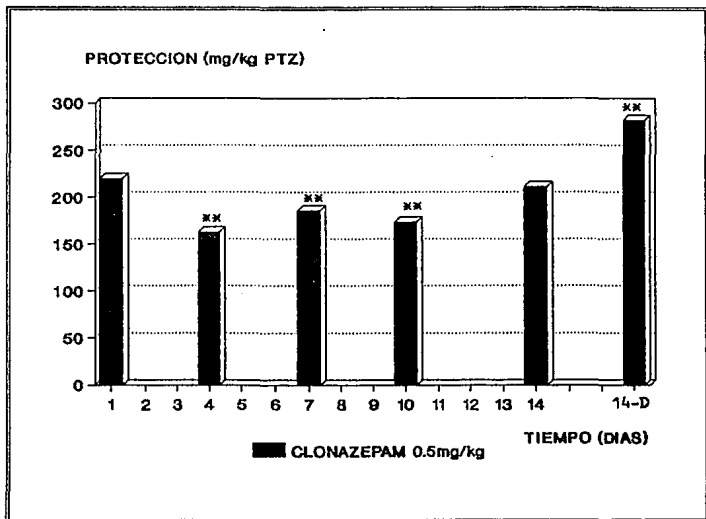


Fig. IV. Pentilentetrazol (mg/kg) administrado para provocar convulsiones clónicas en ratones tratados con Clonazepam, vía i.p., 2 veces al día, durante distintos días de tratamiento.

14-D: Período de tratamiento de 14 días. El último día se administró el doble de la dosis de Clonazepam (1.0 mg/kg).

\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

DIAS TOTALES DE TRATAMIENTO	PROTECCION (mg/kg PTZ)	CONCENTRACION PLASMATICA HEPP ( $\mu\text{g/ml}$ )
1	126.1 $\pm$ 15.8	166.3 $\pm$ 35.8
4	84.0 $\pm$ 10.1 $\times\text{x}$	129.9 $\pm$ 10.2 $\times$
7	86.9 $\pm$ 10.4 $\times\text{x}$	155.4 $\pm$ 34.8
10	85.8 $\pm$ 10.4 $\times\text{x}$	129.9 $\pm$ 16.4 $\times$
14	87.6 $\pm$ 13.1 $\times\text{x}$	138.6 $\pm$ 11.5 $\times$
14-D	137.5 $\pm$ 18.2	142.6 $\pm$ 49.3

Tabla II. Pentilentetrazol (mg/kg) administrado para la producción de convulsiones clónicas en ratones tratados con HEPP (100 mg/kg, vía i.p.), 2 veces al día durante diferentes periodos de tratamiento. Valores de concentración plasmática de la HEPP correspondientes a los diferentes días de administración.

14-D: Administración de 200 mg/kg de HEPP, el último día del tratamiento, de un periodo de 14 días.

Los valores representan la media  $\pm$  d.s. (n=9).

\* p < 0.05; \*\* p < 0.01.

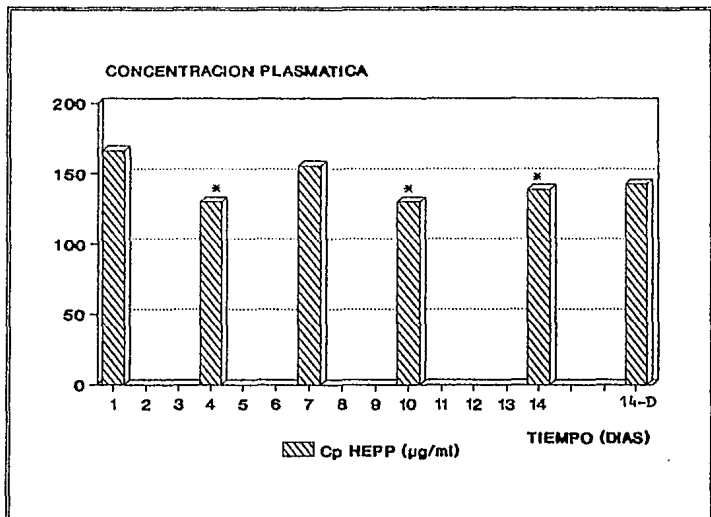


Fig. V. Concentración plasmática de HEPP, administrado a ratones (100 mg/kg, vía i.p.), 2 veces al día durante diferentes períodos de tratamiento.

14-D: Administración de 200 mg/kg de HEPP el último día del tratamiento, de un período de 14 días.

\*  $p < 0.05$ .

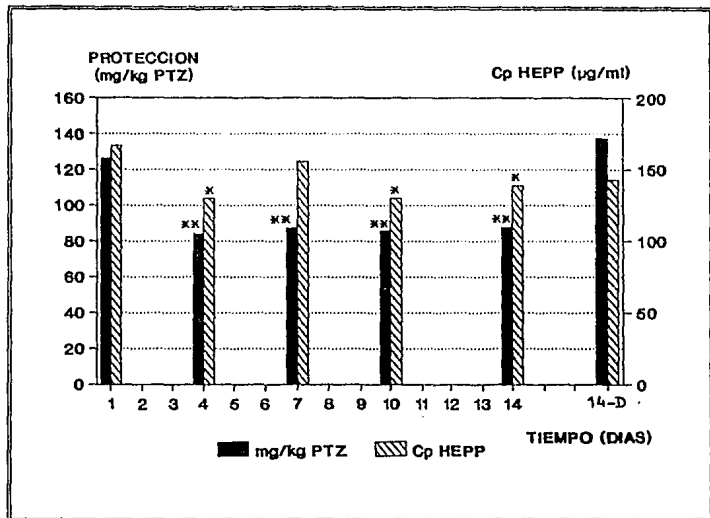


Fig. VI. Pentilentetrazol (mg/kg) administrado para provocar convulsiones clónicas en ratones tratados con la HEPP (100 mg/kg, vía i.p., 2 veces al día) y concentración plasmática de la HEPP durante los diferentes tratamientos.

14-D: Período de tratamiento de 14 días. El último día se administró el doble de la dosis de HEPP (200 mg/kg).

\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

#### 4.2. DISCUSION

En el presente trabajo se evaluó el posible desarrollo de tolerancia de los anticonvulsionantes HEPP y HEPB y la relación con su concentración plasmática.

Los valores correspondientes al efecto anticonvulsionante de la HEPP, muestran, al compararse con el testigo, que el fármaco proporciona protección contra las convulsiones inducidas por el pentilentetrazol. Pero este efecto anticonvulsionante, a su vez, fue disminuyendo en los días 4, 7, 10 y 14 del tratamiento. Lo anterior indica que el fármaco fue menos efectivo al transcurrir el tiempo, lo que sugiere un posible desarrollo de tolerancia hacia su efecto anticonvulsionante.

Sin embargo, cuando se duplicó la dosis de HEPP a 200 mg/kg en el tratamiento de 14 días (14-D), la protección proporcionada fue mayor que en los días anteriores, lo que indica que el efecto protector se reestableció al aumentar la dosis, desapareciendo el efecto antes observado.

La HEPB protegió contra las convulsiones inducidas por pentilentetrazol (PTZ), pero los valores no tienden a disminuir con respecto al tiempo, indicando que no hubo desarrollo de tolerancia. Al duplicar la dosis de HEPB a 200 mg/kg en el periodo de 14 días (14-D), la protección aumentó notablemente, ya que se administró el doble de la cantidad de pentilentetrazol (PTZ) para provocar la convulsión, comparada con el primer día.



## ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

El Clonazepam presentó una disminución en cuanto a su protección contra las convulsiones, sugiriendo un posible desarrollo de tolerancia, ya que se requirió una menor cantidad de pentilentetrazol para provocar la convulsión, lo que significa que se encontraban menos protegidos. Este resultado concuerda con los informados previamente en la literatura, (27,34,65,66) en donde se atribuye que tal efecto se debe a un desarrollo de tolerancia de tipo farmacodinámico (34).

La cuantificación del fármaco, efectuada con HEPP mediante cromatografía de gases, mostró una disminución en la concentración plasmática de la HEPP, indicando que el cambio en la concentración puede relacionarse con una tolerancia farmacocinética, que puede ser debida a una alteración en su metabolismo o a inducción enzimática, factores que deben comprobarse con estudios más específicos.

Relacionando los valores de protección y de concentración plasmática del HEPP, se puede observar que el efecto protector del fármaco se debe a su concentración misma, ya que ésta se encuentra relativamente constante, al igual que la protección. Esto se equipara con otros estudios farmacocinéticos efectuados en rata, en los cuales, el efecto anticonvulsionante se relaciona directamente con la concentración del fármaco en suero y cerebro (30).

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo permitieron llegar a las siguientes conclusiones:

- El fármaco 3-hidroxi-3-etil-3-fenil propionamida (HEPP) a una dosis de 100 mg/kg provocó el desarrollo de tolerancia a su efecto anticonvulsionante.
- El fármaco 4-hidroxi-4-etil-4-fenil butiramida (HEPB) a una dosis de 100 mg/kg no provocó el desarrollo de tolerancia.
- El desarrollo de tolerancia al efecto anticonvulsionante de la HEPP se encuentra relacionado con la concentración plasmática del fármaco.
- La cuantificación plasmática de la HEPP mostró que la tolerancia desarrollada por el fármaco fue de tipo farmacocinético.
- Si la adición de flúor a la molécula de HEPP, repercute en una mayor permanencia del fármaco en el organismo y en una disminución de su metabolismo, es recomendable que estos mismos estudios se realicen con la nueva estructura.
- Es conveniente que los estudios de tolerancia se realicen en otra especie roedora, tal como la rata.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Aguirre, Z.J., Pérez, R., Pacheco, M.F. Mecanismos de acción de HEPB y HEPP sobre la actividad epileptiforme en el hipocampo de cobayo. 3a. Reunión Sobre Compuestos Antiepilepticos Sintetizados en México. CINVESTAV, IPN, México (1992).
- 2) Aird, R., Masland, R., Woodbury, D.M. The Epilepsies: A Critical Review. Raven Press. New York (1984).
- 3) Anderson, R.E., Chiu, P., Woodbury, D.M. Mechanism of tolerance to the anticonvulsant effects of acetazolamide in mice: Relation to the activity and amount of carbonic anhydrase in brain. Epilepsia. 30(2):208-216 (1989).
- 4) Arellano, G.R. Los anticonvulsionantes y su teratogenicidad. Tesis Profesional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, México (1988).
- 5) Beneit, M.V., Velasco, M.A. Farmacodependencia. En: Farmacología y su Proyección a la Clínica. Lorenzo, V. B. 15a. ed., Ed. Oteo, España (1987).
- 6) Bondani, A. La Seguridad de un Nuevo Medicamento: Estudios Toxicológicos. CEMIFAR, A.C., México (1982).
- 7) Bouerne, R.H., Roberts, J.M. Receptores de Medicamentos y Farmacodinamia. En: Farmacología Básica y Clínica. Katzung, G.B. 2a. ed., Ed. El Manual Moderno, México (1986).
- 8) Bowman, W.C., Rand, M.J. Farmacología. Bases Bioquímicas y Farmacológicas. 2a. ed., Ed. Interamericana, México (1985).
- 9) Carvajal, S.G. Planeación de Fármacos Antiepilepticos. En: Epilepsia. Un Enfoque Multidisciplinario. Feria, V.A., Martínez, D., Rubio, D. 2a. ed., Ed. Trillas, México (1989).

- 10) Carvajal, S.G., Meza, T., González, M., Zenteno, G. Síntesis de la DL-3-hidroxi-3-etil-3-(p-fluorofenil)-propionamida (DL-HEPP-pF) y la DL-3-hidroxi-3-metil-3-(p-fluorofenil)-propionamida (DL-HMPP-pF) anticonvulsiantes de vida media más larga. 3a Reunión Sobre Compuestos Antiepilépticos Sintetizados en México. CINVESTAV, IPN, México (1992).
- 11) Carvajal, S.G., Russek, M., Tapia, R., Massieu, G. Anticonvulsive action of substances designed as inhibitors of  $\gamma$ -aminobutyric acid  $\alpha$ -keto glutaric acid transaminase. Biochem. Pharm. 13:1059-1069 (1964).
- 12) Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal of Revised Clinical and Electroencefalographic Classification of Epileptic Seizure. Epilepsia. 22:489-501 (1981).
- 13) Cooper, J., Bloom, F., Roth, R. Las Bases Bioquímicas de la Neurofarmacología. 2a edición. El Manual Moderno. México. (1984)
- 14) Cox, T.C., Jacobs, M.R. Drugs and Drug Abuse. Addiction Research Foundation, Canada (1983).
- 15) Crossland, J. Lewis's Pharmacology. Fifth Edition, Churchill Livingstone, New York (1980).
- 16) Chamorro, G.A., Carvajal, G., Salazar, S., Ulloa, V., Martínez, E., Salazar, M. Estudio teratogénico de la 4-hidroxi-4-etil-4-fenil butiramida y sus dos homólogos inferiores en ratón. X Congreso Nacional de Farmacología. Reunión Regional de la Asociación Latinoamericana en Farmacología. México (1986).
- 17) Chamorro, G.A., Salazar, M., Salazar, S., Carvajal, G. Estudio de toxicidad subcrónica de la 4-hidroxi-4-etil-4-fenilbutiramida, un nuevo anticonvulsiante, en ratón. VI Congreso Brasileiro de Toxicología. Brasil (1989).

- 18) Chan, P.K., O'Hara, G.P. Principles and methods of acute and subchronic toxicity. In: Principles and methods of toxicology. Hayes, W. (ed.), Raven Press, New York (1982).
- 19) DeLorenzo, R.J. Mechanisms of action of anticonvulsant drugs. Epilepsia 29(2):S35-S47 (1988).
- 20) Dipalma, J.R. Drill's pharmacology in medicine. Fourth edition, Mc Graw Hill Book, New York (1971).
- 21) Dixon, R.L., Hall, J.L. Reproductive toxicology. In: Principles and methods of toxicology. Hayes, W. (ed.), Raven Press, New York (1982).
- 22) Eadie, M.J., Tyrer, J.H. Anticonvulsant therapy. Churchill Livingstone, London (1974).
- 23) Espinosa, A., Eluani, J., Chamorro, G. Estudio genotóxico de la 4-hidroxi-4-etil-4-fenil butiramida y de sus dos homólogos inferiores por la prueba de Ames. 3a. Reunión sobre compuestos antiepilépticos sintetizados en México. CINVESTAV, IPN, México (1992).
- 24) Fariello, R.G., Farovetti, C.M., Fisher, R.S. GABAergic function in relation to seizure phenomena. In: Neurotransmitters and Epilepsy. Frontiers of Clinical Neuroscience. Vol. 11. Fisher, R.S., Coyle, J.T. (eds.). Wiley-Liss. (1991) New York USA.
- 25) Garzón de la Mora, P. Aspectos bioquímicos-farmacológicos de los compuestos antiepilépticos. En: Epilepsia. Un enfoque multidisciplinario. Feria, A. Ed. Trillas, México (1989).
- 26) Gay, M.H., Ryan, G.P., Boisse, N.R., Guarino, J.J. Phenobarbital tolerance and physical dependence: chronically equivalent dosing model. Eur. J. Pharmacol. 95:21-29 (1983).
- 27) Gent, J.P., Feeley, M.P., Haigh, J.R. Differences between the tolerance of two anticonvulsant benzodiazepine. Life Sci. 37:849-856 (1985).

- 28) Goldberg, M.A. Anticonvulsivos. En: Fundamentos de farmacología. Bevan, J.A. (ed.), Ed. Harla, México (1982).
- 29) Goldstein, A., Aronow, L. Farmacología. Ed. Limusa, México (1979).
- 30) Gómez, L.E. Estudios farmacocinéticos preclínicos del nuevo anticonvulsionante D,L-3-hidroxi-3-etil-3-fenil propionamida (HEPP). Tesis Doctoral. CINVESTAV, IPN, México (1993).
- 31) Gómez, L.E., Lehman, P.A. Plasma determination of the novel anticonvulsant D,L-3-hidroxy-3-ethyl-3-phenyl propionamide and preliminary pharmacokinetic studies in the rat. J. Chrom. 575:306-310 (1992)
- 32) González, M. Fármacos antiepilépticos. En: Farmacología y su proyección a la clínica. Lorenzo, V.B. (ed.), 15a. ed., Ed. Oteo, España (1987).
- 33) Guyton, A.C. Tratado de fisiología médica. 6a. ed., Ed. Interamericana, México (1987).
- 34) Haigh, J.R., Feely, M., Gent, J.P. Tolerance to the anticonvulsant effect of Clonazepam in mice: no concurrent change in plasma concentration. J. Pharm. Pharmacol. 38:931- 934 (1986).
- 35) Hoogerkamp, A. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship of antiepileptic drugs. Tesis Doctoral. Universidad de Leiden, Netherlands (1992).
- 36) Jaffe, J.H. Drug addiction and drug abuse. In: The pharmacological basis of therapeutics. Goodman & Gilman (eds.), 6th Edition Mc Millan Publishing, New York (1990).
- 37) Jaimes, A., Cruces, M.P., Chamorro, G., Salazar, M., Salazar, S. Evaluación de la genotoxicidad de HEPP y HEPB en células somáticas de Drosophila melanogaster. 3a. Reunión Sobre Compuestos Antiepilépticos Sintetizados en México. CINVESTAV, INP, México (1992).

- 38) Katzung, G., Berkowitz, B. Evaluación básica y clínica de nuevos fármacos. En: Farmacología básica y clínica. Katzung, G. 2a. ed., Ed. El Manual Moderno, México (1986).
- 39) Kim, C.K., Pinel, P.J., Hudda, M.M. Tolerance to the anticonvulsant effects of phenobarbital, trimethadione and clonazepam in kindled rats: cross tolerance to carbamazepine. Pharm. Biochem. Behav. 41:115-120 (1991).
- 40) Krall, R.L., Kupferberg, H.J., Swinyard, E.A. Antiepileptic drug development: I. History and a program for progress. Epilepsia 19:393-408 (1978).
- 41) Kupferberg, H.J. Antiepileptic drug development program: cooperative effort of government and industry. Epilepsia 30(1):S51-S56 (1989).
- 42) Larkin, J.G., Mckee, P.J. Rapid tolerance to acute psychomotor impairment with carbamazepine in epileptic patients. Br. J. Pharmac. 33:111-114 (1992).
- 43) Loomis, T.A. Fundamentos de toxicología. Ed. Acribia, España (1985).
- 44) López, L.R. Relación entre la toxicidad materna y alteraciones compartamentales de la progenie. Caso de la 4-hidroxi-4-etil-4-fenil butiramida (HEPB). Tesis profesional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, México, (1991).
- 45) Löscher, W., Meldrum, B.S. Evaluation of anticonvulsant drugs in genetical animal models of epilepsy. Fed. Proc. 43(2):276-283 (1984).
- 46) Mana, M.J., Kim, C.K., Pinel, J. Tolerance to the anticonvulsant effects of carbamazepine, diazepam and sodium valproate in kindled rats. Pharmacol. Biochem. Behav. 41:109-113 (1991).
- 47) Martínez de Muñoz, D. Modo de acción de algunos fármacos antiepilepticos. En: Epilepsia. Un enfoque multidisciplinario. Feria, A. Ed. Trillas, México (1989).

- 48) Martínez, D., Chamorro, G. Salazar, M., Carvajal, G. Espectro de acción anticonvulsionante de fármacos homólogos a la 4-hidroxi-4-etil-4-fenil butiramida. XIII Congreso Nacional de Farmacología. México (1989).
- 49) McNair, H.M. Cromatografía de gases. Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos. Washington, D.C. (1981).
- 50) Meldrum, B. Convulsant and anticonvulsant drug mechanism. In: Current problems in epilepsy. Vol. I. Baldy-Moulinier, M., Inguar, D.H, Meldrum, B.S. (eds.) John Libbey Eurotext. London (1991).
- 51) Meza, T., Zenteno, G., Carvajal, G. A new homologous series of anticonvulsants: phenyl alcohol amides. Arzneim. Forsh./Drug Research. 40(2):1289-1291 (1990).
- 52) Modell, W., Schild, H. Applied Pharmacology. Saunders Co., Philadelphia (1976).
- 53) Montoya, M.A. Toxicología clínica. Méndez Cervantes (ed.). México (1987).
- 54) Niedermeyer, E. Epilepsy Guide. Diagnosis and Treatment of Epileptic Seizure Disorders. Urban & Schwarzenberg. Baltimore, USA (1983).
- 55) Olsen, R. The GABA Postsynaptic Membrane Receptor-Ionophore Complex. Mol. Cell. Biochem. 39:261-279 (1981).
- 56) Pérez de la Mora, M. Tapia, R. Anticonvulsant effect of 5-ethyl-5-phenyl-2-pyrrolidinone and its possible relationship to aminobutyric acid dependent inhibitory mechanism. Biochem. Pharmacol. 22:2635-2639 (1973).
- 57) Porter, R., Pitlick, W. Antiepilepticos. En: Farmacología básica y clínica. Katzung, B. (ed.) 2a. Ed. El Manual Moderno, México (1986).
- 58) Pratt, J.A. The biological bases of drug tolerance and dependence. Academic Press, London (1991).



- 59) Rall, T.W., Schleifer, L.S. Fármacos efectivos en el tratamiento de la epilepsia. En: Las bases farmacológicas de la terapéutica. Goodman & Gilman (eds.), 8a. ed., Ed. Médica Panamericana, México (1991).
- 60) Richens, A. Drug concentrations in the management of epilepsy. In: Psychopharmacology of anticonvulsants. Sandler, M. Oxford University Press, New York (1982).
- 61) Román, F. Compuestos anticonvulsionantes que actúan sobre el metabolismo del GABA. Tesis Profesional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, México (1988).
- 62) Rubio, D. Generalidades y clasificación de la epilepsia. En: Epilepsia. Un enfoque multidisciplinario. Feria, A. 2a. ed., Ed. Trillas, México (1989).
- 63) Sánchez, R.G. Evaluación de la potencia anticonvulsionante y de la toxicidad de la 4-hidroxi-4-etil-4-fenil butiramida y de sus homólogos inferiores. Tesis de Maestría. CINVESTAV, IPN, México (1987).
- 64) Sandoval, M.E. Neurotransmisión y epilepsia. En: Epilepsia. Un enfoque multidisciplinario. Feria, A. 2a. ed., Ed. Trillas, México (1989).
- 65) Scherkl, R. Frey, H. Tolerance to the anticonvulsant effect of clorazepate and clonazepam in mice. Pharmacol. Toxicol. 62:38-41 (1988).
- 66) Scherkl, R. Frey, H. Anticonvulsant effect of clonazepam in the dog: development of tolerance and physical dependence. Arch. Pharmacodyn. 278: 249-260 (1985).
- 67) Schill, G., Ehrsson, H. Separation Methods for Drugs and Related Organic Compounds. 2nd edition. Swedish Pharmaceutical Press. Sweden (1978).
- 68) Solis, O. Modelos experimentales de epilepsia. En: Epilepsia. Un enfoque multidisciplinario. Feria, A. 2a. ed., Ed. Trillas, México (1989).

- 69) Storch, G. Fundamentos de la cromatografía de gases. Ed. Alhambra, España (1975).
- 70) Swinyard, E.A. Assay of antiepileptic drug activity in experimental animals: Standard tests. In: Anticonvulsant International Enciclopedia of Pharmacology and Therapeutics. Vol. I. Pergamon Press, Oxford (1973).
- 71) Swinyard, E.A., Kupferberg, H. Antiepileptic drugs: detection, quantification and evaluation. Fed. Proc. 44(2):2629-2633 (1985).
- 72) Swinyard, E.A., Woodhead, J. Experimental selection, quantification and evaluation of anticonvulsants. In: Antiepileptic drugs. Levy, R., Meldrum, B. (eds.) 3rd. edition, Raven Press, New York (1989).
- 73) Tranchant, J. Manual práctico de cromatografía en fase gaseosa. Toray-Masson. Barcelona, España (1972).
- 74) Velasco, M.A. Acciones farmacológicas y factores que las modifican. Toxicidad de los fármacos. En: Farmacología y su proyección a la clínica. Lorenzo, V. 15a ed., Ed Oteo, España (1987).
- 75) Velasco, M.A. Introducción a la Farmacología del Sistema Nervioso Central. En: Farmacología y su proyección a la clínica. Lorenzo, B. 15a ed., Ed Oteo, España (1987).
- 76) Wahle, H., Frey, H. Development of tolerance to the anticonvulsant effect of valproate but not to ethosuximide in rat model of absence epilepsy. Eur. J. Pharmacol. 181:1-8 (1990).
- 77) Woodbury, D.M. Convulsants. In: Antiepileptic Drugs: Mechanisms of action. Advances in Neurology. Vol. 27. Glaser, G.M., Penry, J.K., Woodbury, D.M. (eds.) Raven Press. New York (1980).
- 78) Zenteno, G. Síntesis de tres nuevos anticonvulsionantes: propionamidas sustituidas en el carbono tres. Tesis Profesional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, México (1983).