



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE
NANOPARTÍCULAS CON
CLONAZEPAM EN RATONES A
TRAVÉS DEL MODELO PLUS-MAZE**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A N :**

**VILCHIS PEÑALOZA JORGE ALBERTO
YAÑEZ LEDESMA CARLOS**

ASESORES:

**DRA. LUISA MARTÍNEZ AGUILAR
M. EN C. LIDIA RANGEL TRUJANO
DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO**



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 esta 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.

AGRADECIMIENTOS

- Agradecemos a la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación académica que nos brindó, de su mano recorrimos una parte de nuestro camino de la vida con su enseñanza, sus valores y metas. Por sus logros como institución y sus ideales que quedaran para siempre en nuestro pensamiento te decimos: "Por mi raza hablara el espíritu"
- A nuestros Asesores, la Dra. Luisa Martínez Aguilar, a la M. en C. Lidia Rangel Trujano y al Dr. David Quintanar Guerrero por permitirnos trabajar e iniciarnos en el conocimiento de la investigación básica experimental en el área de Farmacología y Tecnología Farmacéutica y habernos transmitido sus conocimientos con amabilidad, comprensión y apoyo para el desarrollo de ésta tesis. Muchas gracias
- Agradecemos el apoyo por parte de la Cátedra de investigación IN1-70 y a la asesora técnica de la QFI Guadalupe Koizumi Castro.
- A nuestros Sinodales: Luisa Martínez Aguilar, QFB Jazmín Flores Monroy, QFI Guadalupe Koizumi Castro, Dra. Flora Adriana Ganem Rondero, QFI. Leticia Zúñiga Ramírez por sus consejos y sugerencias que nos dieron para mejorar nuestro trabajo.
- Muy en especial al QFB Gerardo Leyva Gómez y al Dr. David Quintanar Guerrero del área de Desarrollo experimental de la FESC - UNAM por su apoyo incondicional en la realización de las nanopartículas con clonazepam.
- A nuestros Amigos: Erika, Raúl, Eric, Josafath, Monserrat, Sergio, Marcela, Armando, Isaac, Norma, Heberto, Nancy, Alicia, Alejandro, Gabriela y demás compañeros de la Carrera de QFB generación 28.

A mis Padres

Cesar y Margarita. Porque siempre recibí su apoyo incondicional, cariño y la herencia más hermosa que pudieron darme: mis estudios. Los quiero mucho.

A Mis hermanos

Isela y Cesar. Por sus consejos y ayuda durante mis estudios.

A Michelle

Por ser mi fuerza y templanza...

A Virgen Divina

Muchas gracias por estar conmigo y por permitirme caminar a tu lado en el sendero de la vida. Te amo.

A mis Mascotas

Kity, Navi y Turok, por su incondicional cariño y agradable compañía en mis largas noches de desvelo.

A la UNAM

Jorge Alberto

A mis Padres

No hay palabras que puedan describir mi profundo agradecimiento hacia mis padres, quienes durante todos estos años confiaron en mí; comprendiendo mis ideales y el tiempo que no estuve con ellos.

A Mis hermanos

Mario, Francisco y Yazmín. Por darme compañía, consuelo y apoyo en el momento apropiado.

A Mi entorno

Que me dio las facultades para pensar en mi futuro.

ÍNDICE

Página.

LISTA DE ABREVIATURAS	3
ÍNDICE DE TABLAS	4
ÍNDICE DE GRÁFICAS	6
ÍNDICE DE FIGURAS	7
RESUMEN.	8
I. INTRODUCCIÓN	9
II. MARCO TEÓRICO	10
II.1 Sistema Nervioso Central	10
II.1.1 Estructura y función.	10
II.1.1.1 El sistema nervioso central	10
II.1.1.2 La Neurona	12
II.1.1.3 Fibras Nerviosas	12
II.1.1.4 Sinapsis	13
II.1.1.6 Ansiedad	15
II.1.2 Barrera Hematoencefálica	17
II.1.2.1 Mecanismos de transporte de sustancias a través de la BHE.	19
II.2 Benzodiazepinas	23
II.2.1 Clasificación de las Benzodiazepinas	24
II.2.2 Mecanismo de acción de las Benzodiazepinas	26
II.2.3 Farmacocinética	30
II.2.4 Clonazepam	33
II.2.5 Mecanismo de acción de Clonazepam	34
II.2.6 Posología	34
II.2.7 Farmacocinética	35
II.3 Estudios sobre la ansiedad con animales	36
II.3.1 Modelos basados en respuestas incondicionadas	37
II.3.2 Modelos basados en respuestas condicionadas	38
II.4 Modelos: Plus Maze Elevado y Prueba de Tracción	40
II.4.1 Comportamiento de los roedores en el Plus Maze	41
II.4.2 Modelo de Tracción.	42
Fig. 8 Modelo de Tracción	43
II.5 NANOTECNOLOGIA.	43
II.5.1 Transportadores Submicrónicos de Fármacos. (TSF)	44
II.5.2 Nuevas estrategias para el transporte de fármacos a través de la BHE.	45
II.5.3 Fármacos formulados en nanopartículas dirigidos hacia el cerebro.	48
II.5.4 Liberación de fármacos a partir de NP's.	51
II.5.5 Nanopartículas lipídicas: antecedentes y campo de aplicación.	55
II.5.6 Importancia de las nanopartículas lipídicas.	56
II.5.7 Ingredientes utilizados para elaborar nanopartículas lipídicas.	56

III. OBJETIVOS	58
IV. HIPOTESIS	59
V. MATERIALES Y METODOS	60
V.1 Metodología y Diagrama de flujo	61
V.2 Evaluación	65
V.2.1 Lote: Blanco	65
V.2.2 Lote: Solución Lipídica	65
V.2.3 Dispersión de Clonazepam a pH 7 a Dosis de 0.1mg/Kg.	66
V.2.4 Solución De Diazepam (Solución Testigo a Dosis de 0.1mg/Kg.)	67
V.2.5 Solución de Nanopartículas cargadas con los Principios activos a Dosis 0.1mg/Kg y a Dosis media 0.05mg/Kg.	67
V.2.6 Solución de Nanopartículas placebo	67
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	68
VII. Discusión.	83
VIII. CONCLUSIONES	92
IX. PERSPECTIVAS	93
X. REFERENCIAS	94

LISTA DE ABREVIATURAS

·	BHE	Barrera Hematoencefálica
·	SNC	Sistema Nervioso Central
·	p.a.	Principio Activo
·	NP	Nanopartículas/Nanocapsulas
·	NP's	Nanopartículas lipídicas
·	#EBA	Entradas en los brazos abiertos.
·	#EBC	Entradas en los brazos cerrados.
·	tBA	Tiempo de permanencia en los brazos abiertos.
·	tBC	Tiempo de permanencia en los brazos cerrados.
·	t centro	Tiempo de permanencia en el centro.
·	LDA (macerado)	Lípido disperso en agua (macerado).
·	EPSP	Potencial postsináptico excitador
·	IPSP	Potencial postsináptico inhibitor
·	IM	Intramuscular
·	IV	Intravenosa
·	TSF	Transportadores submicrónicos de fármacos
·	NE's	Nanoesferas
·	Problema N° 1	NP's con clonazepam a dosis de 0.1mg/Kg
·	Problema N° 2	NP's con clonazepam a dosis de 0.05mg/Kg
·	Problema N° 3	NP's sin p.a.
·	Problema N° 4	Lípido macerado disperso en agua.
·	Problema N° 5	Dispersión de clonazepam a pH 7
·	P.M.	Peso Molecular
·	LCR	Líquido Cefalorraquídeo
·	FDA	Food and Drug administration

ÍNDICE DE TABLAS

• Tabla 1: Propiedades ideales de NP´s polimétricas para la entrega de fármaco a través de la BHE [52].	50
• Tabla 2: Ejemplos de NP´s usadas para la entrega de fármacos a través de la BHE [52].	51
• Tabla 3: Lotes de trabajo	64
• Tabla 4: Composición y algunas propiedades fisicoquímicas del Compritol® ATO 888	67
• Tabla 5: Número de entradas y tiempo de permanencia en el modelo de Plus-Maze, lote blanco.	69
• Tabla 6: Porcentaje de entradas en brazos abiertos y porcentaje de tiempo de permanencia, lote blanco.	69
• Tabla 7: Número de entradas y tiempo de permanencia en el modelo de Plus-Maze, lote testigo.	70
• Tabla 8: Porcentaje de entradas en brazos abiertos y porcentaje de tiempo de permanencia, lote testigo.	70
• Tabla 9: Número de entradas y tiempo de permanencia en el modelo de Plus-Maze, lote problema N° 1.	71
• Tabla 10: Porcentaje de entradas en brazos abiertos y porcentaje de tiempo de permanencia, lote problema N° 1.	71
• Tabla 11: Número de entradas y tiempo de permanencia en el modelo de Plus-Maze, lote problema N° 2.	72
• Tabla 12: Porcentaje de entradas en brazos abiertos y porcentaje de tiempo de permanencia, lote problema N° 2.	72
• Tabla 13: Número de entradas y tiempo de permanencia en el modelo de Plus-Maze, lote problema N° 3.	73
• Tabla 14: Porcentaje de entradas en brazos abiertos y porcentaje de tiempo de permanencia, lote problema N° 3.	73
• Tabla 15: Número de entradas y tiempo de permanencia en el modelo de Plus-Maze, lote problema N° 4.	74
• Tabla 16: Porcentaje de entradas en brazos abiertos y porcentaje de tiempo de permanencia, lote problema N° 4	74

• Tabla 17: Número de entradas y tiempo de permanencia en el modelo de Plus-Maze, lote problema N° 5.	75
• Tabla 18: Porcentaje de entradas en brazos abiertos y porcentaje de tiempo de permanencia, lote problema N° 5.	75
• Tabla 19: Resultados de la Prueba de Tracción, lote blanco.	77
• Tabla 20: Resultados de la Prueba de Tracción, lote testigo.	77
• Tabla 21: Resultados de la Prueba de Tracción, lote problema N° 1.	78
• Tabla 22: Resultados de la Prueba de Tracción, lote problema N° 2.	78
• Tabla 23: Resultados de la Prueba de Tracción, lote problema N° 3.	79
• Tabla 24: Resultados de la Prueba de Tracción, lote problema N° 4.	79
• Tabla 25: Resultados de la Prueba de Tracción, lote problema N° 5.	80
• Tabla 26 porcentajes de entradas en los brazos abiertos.	81
• Tabla 27 Análisis de varianza de los porcentajes de entradas en brazos abiertos.	81
• Tabla 28 Porcentajes de entradas en los brazos cerrados.	82
• Tabla 29: Análisis de varianza de los porcentajes de tiempo de permanencia en brazos abiertos	83
• Tabla 30 Benzodiazepinas; vida media, uso y dosis recomendada	25

ÍNDICE DE GRÁFICAS

- Porcentaje de entradas en los brazos abiertos. 76
- Porcentaje de tiempo de permanencia en los brazos abiertos. 76

ÍNDICE DE FIGURAS

• Fig. 1 Composición estructural de una neurona.	13
• Fig. 2 Mecanismo de transporte a través de la BHE.	22
• Fig. 3 Representación estructural de la Benzodiazepina.	
• Fig. 4 Supercomplejo del receptor GABA/ionóforo de Cl ⁻ donde se esquematiza, la función de las benzodiazepinas, aumentando la afinidad del neurotransmisor GABA por su receptor, facilitando así el paso de los iones Cl ⁻ hacia el interior de la célula.	27
• Fig. 5. Mecanismo de acción de las benzodiazepinas	28
• Fig. 6 Estructura del Clonazepam	33
• Fig. 7 Modelo de “Elevated Plus-Maze” Lister, 1987 [38]	42
• Fig. 8 Modelo de Tracción	43
• Fig.9 Mecanismos propuestos para incrementar el paso de fármacos a través de la BHE [52].	47
• Fig.10 Tipos de nanopartículas cargadas con fármaco para liberación en el SNC [52].	51
• Fig. 11. Análisis farmacocinético de la liberación de fármaco a partir de NP´s [52].	52
• Fig. 12 Mecanismos de liberación de fármacos a partir de NP´s, puede ser uno o una combinación de cualquiera o de todos los mecanismos propuestos [52].	52
• Fig. 13 Diagrama De Flujo.	63
• Fig. 14 Cuadro Control de Trabajo	64
• Fig. 15 Porcentaje de entradas en los brazos abiertos de el lote blanco, NP´s a (0.1mg/Kg.), NP´s a (0.05mg/Kg.), NP´s sin p.a., lípido disperso en agua macerado y clonazepam disperso en agua a pH 7.	75
• Fig. 16 Porcentaje de tiempo de permanencia en los brazos abiertos de el lote blanco, NP´s a (0.1mg/Kg.), NP´s a (0.05mg/Kg.), NP´s sin p.a., lípido disperso en agua macerado y clonazepam disperso en agua a pH 7.	75
• Fig. 17. Mecanismo de digestión de mono, di y triglicéridos. [72]	87
• Fig.18. Mecanismo del efecto de promoción de absorción de lípidos. [70]	88

RESUMEN.

En el presente trabajo se cuantificó el efecto ansiolítico del clonazepam encapsulado en NP's lipídicas a dosis terapéutica y dosis media terapéutica, NP's sin clonazepam (placebo), lípido disperso en agua macerado y dispersión de clonazepam a pH 7 en ratones albinos machos en el modelo Plus-Maze. Además se utilizó el Modelo de Tracción para verificar si los animales no presentaban relajación muscular, el cual refleja un efecto de sedación y no el efecto ansiolítico. Los resultados obtenidos, muestran que el clonazepam encapsulado en NP's a dosis terapéutica y dosis media terapéutica tiene un efecto ansiolítico ya que aumentaron considerablemente el porcentaje de entradas y el tiempo de permanencia en los brazos abiertos en el modelo Plus-Maze en comparación dispersión de clonazepam a pH 7.

I. INTRODUCCIÓN

Los usos clínicos de benzodiazepinas como ansiolíticos son limitados por sus efectos secundarios. Por este motivo es importante incursionar en una nueva tecnología de preparación de medicamentos como es la “nanotecnología” en donde las dimensiones de las características de investigación son menores que 1/1000 del diámetro de un cabello humano [1]. Las NP's muestran una gran ventaja sobre los transportadores de fármacos convencionales, como: una excelente tolerabilidad, buena estabilidad física, protección de fármacos lábiles, alta carga de fármaco y control de liberación de fármaco. [2]

En este estudio experimental se pretende evaluar el efecto ansiolítico del clonazepam el cual se encuentra en un transportador coloidal con una estructura lipídica matricial con un diámetro promedio en el rango nanométrico. El fundamento principal que sustenta el desarrollo de la presente investigación es que básicamente los lípidos tienen una amplia aplicación porque son bien tolerados por el cuerpo (como glicéridos, compuestos de ácidos grasos que se encuentran presentes en las emulsiones para nutrición parenteral) y además la BHE muestra un menor impedimento al paso de sustancias lipofílicas (además de tomar en cuenta también el tamaño de partícula y la carga eléctrica de la superficie) por lo que el transporte de clonazepam (benzodiazepina) en nanopartículas puede ser facilitado por la composición lipídica del acarreador, lo que representaría una alternativa real para la administración del fármaco con sitio de acción en el cerebro durante enfermedades crónicas, también la composición lipídica de las NP's mejora el transporte de fármacos lipofílicos a su sitio de acción (aumento de biodisponibilidad, menor dosis y costo), los componentes utilizados son muy bien tolerados por el organismo, enmascara las propiedades del fármaco hasta que las NP's son degradadas y el fármaco es liberado, disminuyendo de ésta manera los efectos adversos en órganos periféricos; en general constituyen un sistema de vectorización viable y prometedor aún en desarrollo. [2,3,4 ,5]

Para evaluar el efecto ansiolítico del clonazepam se usaron dos modelos farmacológicos, uno para medir el efecto ansiolítico llamado Plus-Maze y el otro para verificar que no se ha sobrepasado el efecto a relajación muscular mediante un modelo llamado Prueba de Tracción.

II. MARCO TEÓRICO

II.1 Sistema Nervioso Central

El sistema nervioso. Es el que pone en relación al individuo con los procesos del mundo exterior e interior y es el principal coordinador de las funciones del organismo [6]

II.1.1 Estructura y función.

Comprende dos partes fundamentales, como se expresa a continuación:

1.- El sistema nervioso somático, cuya función principal es el ajuste del organismo con el medio exterior. Se divide a su vez en dos secciones:

a) el sistema nervioso central, que comprende los centros nerviosos.

b) el sistema nervioso periférico, que corresponde a los nervios.

2.- El sistema nervioso autónomo, que se refiere a la inervación visceral y cuya función es el ajuste del organismo con el medio interno [6].

Desde un punto de vista anatómico, es necesario identificar cuatro componentes principales: el sistema nervioso central, el sistema nervioso periférico, que incluye los pares craneales, el sistema autónomo y el sistema neuroendócrino [7].

II.1.1.1 El sistema nervioso central

El sistema nervioso central está formado por el cerebro y la médula espinal. El cerebro se encuentra en la cavidad craneal y está protegido por las meninges. Se divide en tres componentes principales que son, en orden ascendente, es decir, desde la parte caudal (cola) a la cervical (cabeza) del sistema nervioso, el cerebro posterior (también llamado rombencéfalo), el cerebro medio (el mesencéfalo) y el cerebro anterior (el prosencéfalo) [7].

El sistema nervioso periférico

El sistema nervioso periférico está formado por las neuronas situadas fuera del sistema nervioso central. El adjetivo *periférico* describe la distribución anatómica de este sistema, pero funcionalmente es artificial. Los cuerpos celulares de las fibras motoras periféricas, por ejemplo, están situados en el sistema nervioso central [7].

El sistema nervioso autónomo

El sistema nervioso autónomo es la parte del sistema nervioso que controla la actividad de los componentes viscerales del cuerpo humano. Se denomina “autónomo” porque realiza sus funciones de forma automática, lo que significa que su funcionamiento no puede controlarse fácilmente a voluntad. Desde un punto de vista anatómico, el sistema autónomo tiene dos componentes principales: el sistema nervioso simpático y el parasimpático. Los nervios simpáticos que controlan la actividad visceral proceden de las porciones torácica y lumbar de la médula espinal; los nervios parasimpáticos proceden del tronco encefálico y de la porción sacra de la médula espinal [7].

Desde un punto de vista fisiológico, no puede hacerse una generalización única que se aplique a la forma en que los sistemas nerviosos simpático y parasimpático controlan diferentes órganos corporales. En la mayor parte de los casos, los órganos viscerales están inervados por ambos sistemas, y cada uno de ellos tiene un efecto opuesto en un sistema de controles y equilibrios. El corazón, por ejemplo, está inervado por nervios simpáticos cuya excitación produce una aceleración del ritmo cardíaco, y también por nervios parasimpáticos cuya excitación produce un retardo del mismo. Cada sistema puede estimular o inhibir los órganos que inerva. En otros casos, los órganos son controlados de forma predominante o exclusiva por uno de los dos sistemas. Una función vital del sistema nervioso autónomo es el mantenimiento de la homeostasia (estado estable de equilibrio) y la adaptación del organismo animal a su medio ambiente externo. La homeostasia es el estado de equilibrio de las funciones corporales conseguido por un proceso activo; el control de la temperatura corporal, del agua y de los electrolitos son ejemplos de procesos homeostáticos [7].

Desde el punto de vista farmacológico, no hay un neurotransmisor único asociado a funciones simpáticas o parasimpáticas, como se creyó en otros tiempos. La antigua creencia de que la acetilcolina era el transmisor predominante del sistema autónomo tuvo que abandonarse cuando se encontraron nuevas clases de neurotransmisores y neuromoduladores (p. ej., dopamina, serotonina, purinas y diversos neuropéptidos). Recientemente, los científicos han resucitado el enfoque conductual del sistema nervioso autónomo. El sistema nervioso autónomo participa en la reacción instintiva de lucha o huida. [7]

II.1.1.2 La Neurona

La unidad estructural y fisiológica del sistema nervioso es la neurona y en el hombre existen unos 10000 millones de neuronas. Dicha unidad celular comprende; a) el cuerpo celular o soma, que constituye la parte fundamental y la nutrición de las prolongaciones depende de su conexión con aquel; b) las dendritas constituyen el sistema receptivo de la neurona, correspondiente algunas veces a la fibra aferente a la célula; b) el axón forma el sistema de descarga y constituye la fibra nerviosa eferente (Fig. 1) [6].

II.1.1.3 Fibras Nerviosas

Las fibras nerviosas recién citadas además del axón poseen por lo general una vaina de mielina de naturaleza esencialmente, que es producida por las células de Schwann que se encuentran a lo largo de la fibra y cuya membrana exterior se denomina neurilema. No todas las fibras poseen mielina, de manera que existen fibras mielínicas y amielínicas, en estas últimas las células de Schwann no forman mielina. Lo descrito corresponde al sistema nervioso periférico, en el sistema nervioso central no existen células de Schwann y la mielina es formada por las células de la glia denominadas oligodendrocitos [6].

II.1.1.4 Sinapsis

Se denomina sinapsis a la conexión entre dos neuronas, en ella la conducción se efectúa siempre en un solo sentido, pasando el impulso nervioso desde las terminaciones del axón de una neurona a las dendritas de la otra. En dicha sinapsis las membranas de ambas neuronas “membrana presináptica y postsináptica” están separadas por una hendidura sináptica, mientras que las terminaciones presinápticas poseen las llamadas vesículas sinápticas visibles al microscopio electrónico [6].

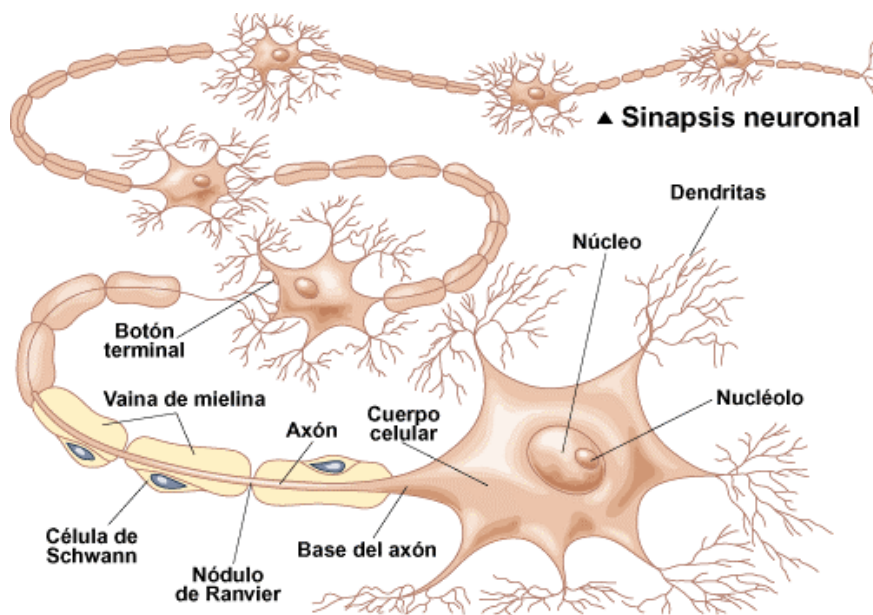


Fig. 1 Composición estructural de una neurona. [8]

II.1.1.5 Excitación e Inhibición Central

El sistema nervioso central funciona produciendo aumento o disminución de la función de las células, lo que se denomina respectivamente excitación e inhibición y esos fenómenos se producen esencialmente a nivel de la sinapsis [6].

- A) Excitación central: se acepta actualmente que al llegar el impulso nervioso a las terminaciones presinápticas de una fibra excitadora libera un transmisor químico excitador, sustancia que atraviesa la hendidura sináptica y provoca la despolarización de la membrana postsináptica. El

potencial de reposo de transmembrana medido con microelectrodo, que es alrededor de -70milivoltios, al aumentar la permeabilidad al ión sodio que penetra a través de la membrana, da lugar al potencial postsináptico excitador (EPSP) que al alcanzar el nivel crítico de -60milivoltios origina un potencial de acción que estimula la neurona y se propaga al axón, descargando así un impulso nervioso [6].

B) Inhibición central: en este caso, al llegar el impulso a las terminaciones presinápticas de una fibra inhibidora libera también un transmisor químico inhibidor que atraviesa la hendidura sináptica y provoca la hiperpolarización de la membrana postsináptica. Se produce un aumento de la permeabilidad al ión potasio que aumenta su salida y en esta forma da lugar al potencial postsináptico inhibidor (IPSP). De manera que el reposo pasa de -70 a -80milivoltios, medido con microelectrodo. Esta hiperpolarización es capaz de reducir el EPSP por debajo del nivel crítico de descarga, lo que bloquea el proceso de despolarización produciéndose por lo tanto la inhibición [6].

Debe considerarse que las mismas células nerviosas pueden recibir impulsos excitadores e inhibidores de otras partes del sistema nervioso y así mismo un sistema neuronal puede ejercer influencias de ambos tipos sobre distintas células. Así algunas porciones de la formación reticular son excitadoras mientras que otras son inhibidoras sobre las células motoras espinales. Los procesos de inhibición son de extraordinaria importancia, constituyendo mecanismos reguladores. Es así que los centros superiores en muchas ocasiones inhiben a los centros inferiores o bien los fármacos que por disminución de la inhibición pueden provocar un aumento de la actividad funcional de centros inferiores tratándose de fenómenos llamados de liberación. [9].

II.1.1.6 Ansiedad

La ansiedad puede ser una emoción normal y un trastorno psiquiátrico, dependiendo de su intensidad y de su repercusión sobre la actividad de la persona. En condiciones normales constituye uno de los impulsos vitales que motiva al individuo a realizar sus funciones y a enfrentarse a situaciones nuevas. La ansiedad se convierte en patológica cuando en lugar de favorecer el comportamiento, interfiere en él y cuando alcanza tal protagonismo que el individuo desplaza hacia ella toda su atención. [9]

En términos patológicos, la ansiedad puede describirse como la vivencia de un sentimiento de amenaza, de expectación tensa ante el futuro y de alteración del equilibrio psicosomático en ausencia de un peligro real o, por lo menos, desproporcionada en relación con el estímulo desencadenante [10].

Se considera que en los trastornos de ansiedad interviene cierta predisposición biológica o vulnerabilidad, que puede tener una base genética o haber sido adquirida en las experiencias de los primeros años de vida. La manera en que los acontecimientos y el medio ambiente impacten en un cerebro bien o mal configurado podría conducir a la aparición de la ansiedad patológica. [10]

También pueden cursar con ansiedad enfermedades de carácter propiamente psicótico, como los estados esquizofrénicos, los maníacos y los depresivos.

La ansiedad debe distinguirse de otras enfermedades, para su tratamiento por lo que se han descrito los siguientes síntomas generales: palpitaciones, taquicardia, opresión torácica, dificultad para respirar, sensación sofocante de asfixia, indigestión, diarrea, vértigo, cambios en el apetito, transpiración, micción frecuente, rubor, dermatitis ficticia, cefalea, dolores musculares, insomnio y temores irrazonables. [11]

Quizá en los humanos el principal mecanismo productor de ansiedad sea el estrés. El término se refiere a una respuesta de adaptación que se acompaña de cambios fisiológicos y conductuales fácilmente identificables y generalmente provocados por situaciones que pongan en peligro la integridad del individuo; como el calor, el frío, las infecciones, los cambios extremos del medio

ambiente, entre otros. Para muchos investigadores, el estrés es sinónimo de ansiedad. Sin embargo; se trata de situaciones aunque diferentes vinculadas. [11]

La génesis de la ansiedad es muy complicada, aunque generalmente su origen esta basada en las excesivas estimulaciones que llegan al organismo por la actividad desgastante, a la sobreestimulacion nerviosa, la cual es provocada por elevada responsabilidad, preocupaciones, disgustos y defectos de la armonía familiar. Este tipo de actividad humana convierte a la mayor parte de los individuos en un blanco fácil del estrés y de la ansiedad. [12]

En la actualidad, los fármacos más vendidos en todos los continentes son aquellos utilizados para tratar la ansiedad; además, existe un incremento alarmante en el uso de fármacos antidepresivos, sustancias que alivian la depresión que es la etapa siguiente a la ansiedad. [12]

Los fármacos utilizados para atenuar la reacción emocional producida por la ansiedad son denominados como ansiolíticos y en los últimos años el principal avance en el estudio de la ansiedad, ha sido la obtención de fármacos ansiolíticos más específicos. Estas sustancias han servido como herramientas para estudiar y entender la neurofisiología de la ansiedad. [12]

Desde tiempos muy remotos, el hombre ha buscado sustancias capaces de modificar los efectos del estrés y de las sensaciones de tensión y ansiedad. La mayor parte de estos esfuerzos, han finalizado con el desarrollo de sustancias que provocan sedación; quizás el ejemplo más característico sea el etanol y el desarrollo de agentes psicofarmacológicos que administrados bajo el contexto de una terapia de apoyo ayudan a aliviar los síntomas de la ansiedad, y de la depresión. [12]

En el año de 1957 Léo Sternbach del grupo Hoffman la Roche de New Jersey, sintetizaron e introdujeron al mercado a las benzodiazepinas, las cuales presentaron efectos más específicos sobre la ansiedad. [13]

Los efectos ansiolíticos de las benzodiazepinas han sido estimados en animales de laboratorio, entre las benzodiazepinas más importantes están el clordiazepóxido, el diazepam, el oxazepam, el clorazepato, el lorazepam y el clonazepam. Estas sustancias comparten varias propiedades físicas, terapéuticas y presentan una relación estructura actividad farmacológica. En particular, todas ellas provocan diferente efecto de acuerdo al aumento de la dosis como: ansiolisis, sedación y sueño, es decir son hipnóticas, también poseen acciones anticonvulsivas, lo cual las hace útiles en el tratamiento de la epilepsia. Por esta razón cuando se manifiestan sus efectos sedantes, también se observan varios grados de relajación muscular. [11]

II.1.2 Barrera Hematoencefálica

Aunque el SNC está muy vascularizado, las propiedades histológicas y funcionales de su red capilar forman la llamada Barrera Hematoencefálica (BHE), que restringe el paso de la mayoría de las moléculas desde la corriente circulatoria hasta el parénquima del SNC. Como se mencionó anteriormente la BHE consiste en uniones estrechas continuas entre las células endoteliales capilares, sin fenestraciones y con notable escasez de moléculas pinocitóticas. Además alrededor de los capilares encefálicos hay una membrana basal prominente, limitada en el exterior por una capa continua de prolongaciones celulares de neuronas y células gliales (astrocitos y oligodendrocitos). [9]

Por consiguiente, en el SNC no es posible que el transporte de moléculas de la corriente circulatoria al espacio perivascular se realice por difusión simple, sino que requiere que la molécula sea: 1) suficientemente pequeña y liposoluble para cruzar la membrana celular y el citoplasma de la célula endotelial, 2) Se fije a un transportador selectivo y se traslade por transporte activo (es decir con consumo de energía). [9]

En unas cuantas estructuras que rodean al tercero y el cuarto ventrículo, como el área postrema, el órgano subfornical y la prominencia media la BHE es débil o permite fugas, por lo que dichas partes del encéfalo están funcionalmente fuera de la BHE y, por tanto pueden actuar como sensores de las propiedades

químicas y osmóticas de la sangre; luego la información así recabada se transmite por medio de impulsos neuronales a otras regiones encefálicas que están dentro de la BHE para activar las respuestas apropiadas. En el caso de la eminencia media, la BHE permite que las hormonas y los factores de liberación producidos por las neuronas hipotalámicas se desplacen fácilmente del espacio perivascular a la corriente circulatoria. [10]

La BHE es muy poco permeable, de modo que restringe drásticamente el número de fármacos que pueden cruzarla de la sangre al SNC. Con excepción de las moléculas para las que hay sistemas de transporte específicos (P. ej., glucosa, aminoácidos, transferrina e insulina), sólo moléculas lipófilas entran en el encéfalo. El coeficiente de partición aceite-agua de una molécula dada puede servir de indicador de su capacidad para entrar al encéfalo. [10]

Se han desarrollado varias estrategias para facilitar el ingreso de fármacos al SNC. El procedimiento más común consiste en efectuar cambios moleculares para incrementar la liposolubilidad. Experimentalmente, se administra en forma directa el fármaco al interior de los ventrículos encefálicos o al espacio subaracnoideo a fin de salvar la BHE. Pero esto resulta demasiado peligroso para aplicaciones terapéuticas repetidas en seres humanos, excepto la inyección subaracnoidea raquídea lumbar. Una de las estrategias más perfeccionadas y eficaces consiste en fijar el fármaco en un portador como algún anticuerpo contra receptores de moléculas que penetran al SNC por transporte activo (p. ej., anticuerpos contra receptores de transferrina). El complejo fármaco-anticuerpo se fija al receptor y con ello se activan mecanismos de transporte activo. [10, 14]

Se ha comprobado desde hace dos décadas que el cerebro sólo oxida glucosa para obtener la energía necesaria que satisfaga su demanda estructural y funcional. En el cerebro adulto la ración de consumo de oxígeno y glucosa se halla en equilibrio para mantener el metabolismo oxidativo y la producción de oxígeno. [10]

Los requerimientos metabólicos y el flujo sanguíneo cerebral suelen correlacionarse, de tal manera que un incremento de la energía se acompaña normalmente de un aumento del flujo sanguíneo mientras que una reducción

energética conduce a una atenuación del flujo cerebral. En varias especies animales incluido el hombre se ha visto que alteraciones en el sistema de flujo cerebrovascular producen una disfunción paralela en la actividad neuronal. Por lo tanto para garantizar un normal funcionamiento neuronal, en condiciones fisiológicas, parecen esenciales dos requisitos: a) un flujo sanguíneo cerebral normal y b) la integridad de la BHE. [15]

II.1.2.1 Mecanismos de transporte de sustancias a través de la BHE.

La BHE desempeña una función esencial en el mantenimiento de la homeostasis cerebral. Las sustancias liposolubles entran al cerebro por difusión a través de la lámina endotelial. La mayoría de los nutrientes, que suelen ser hidrosolubles, requieren el uso de mecanismos de transporte activo para incorporarse al cerebro, existiendo transportadores especializados para glucosa, aminoácidos, ácidos monocarboxílicos y precursores de ácidos nucleicos y aminos, que garantizan el aporte de nutrientes, hormonas y sustancias precursoras de neurotransmisores cerebrales. Por consiguiente, la BHE regula (Fig 2) el entorno nutritivo y homeostático del SNC permitiendo el acceso de sustancias a través de tres mecanismos: (i) rutas extracelulares, (ii) difusión plasmalemal y (iii) sistemas selectivos de transporte.

Las rutas extracelulares funcionan mediante el pasaje residual que ocurre en torno a las células endoteliales, el espacio subaracnoideo y otros puntos de posible traslado de sustancias desde el torrente sanguíneo. La tasa de pasaje por esta ruta es muy baja, equivalente a la de la albúmina, con un trasiego de sangre a cerebro unidireccional y una constante de entrada (K_i) de 10^{-5} a 10^{-6} ml/g/min. Esto indica que la cantidad de sustancia que se encuentra en 0.01 a 0.001 ml de plasma entra en un gramo de cerebro cada minuto.

La segunda ruta representada por la difusión a través de membranas, depende de sustancias que entran en la vertiente luminal-sanguínea de las células emergiendo de la parte abluminal o cerebral. Las propiedades de esta difusión depende fundamentalmente de las características químicas de cada molécula, su liposolubilidad, sus enlaces hidrogenados, su peso molecular, carga iónica, estructura tridimensional, unión a proteínas y capacidad de autoagregación.

Las propiedades de la membrana a través de la cual pasan estas sustancias también importa, sobre todo la carga de superficie y la fluidez de la membrana.

La tercera ruta altamente selectiva, es la de los sistemas de transporte saturables, como el sistema de las hexosas, que transporta la glucosa al interior del cerebro o los sistemas para aminoácidos neutros, como la tripsina. Estos sistemas permiten el acceso de sustancias específicas al cerebro con una velocidad 10 – 1000 veces superior a la que les permitirían otros sistemas no saturables. Una de las características de estos sistemas de transporte selectivo es que se autorregulan en función de la demanda metabólica y cambian en el tiempo, desde las fases de desarrollo hasta la senectud. También están influenciados por neurotoxinas y cualquier defecto de funcionamiento puede conducir a enfermedades del SNC.

Una función recientemente atribuida a la BHE es su capacidad para controlar el intercambio de moléculas con propiedades informativas, como péptidos y proteínas reguladoras, entre el SNC y la circulación periférica. Ejemplos de estas moléculas son la insulina y la leptina que entran en el cerebro a través de la BHE para controlar las conductas apetitivas; o la metionina-encefalina, que sale del cerebro para controlar las conductas adictivas al alcohol; o también diversas citocinas que entran y salen del cerebro para regular la red neuronal. Algunas células del sistema inmune atraviesan la BHE por diapédesis para ejercer sus funciones lejos de su entorno original.

Otros procesos como la endocitosis adsorptiva, que ocurre normalmente o son activados por agentes patógenos, también pueden constituir nuevos mecanismos de trasiego molecular a través de la BHE. La BHE muestra una reducida endocitosis comparada con otros tejidos, no obstante, el transporte vesicular (mediado vía receptor, por adsorción o endocitosis de fluido de fase) tiene una función importante en la liberación de diversos compuestos hacia el cerebro. Como ejemplo, el hierro enlazado a transferrina es endocitosado hacia el interior de la microvasculatura cerebral a través de un mecanismo mediado por receptores, de manera similar, la insulina y lipoproteínas de baja densidad exhiben también un paso a través de la BHE mediada por receptor. La endocitosis por adsorción es el mecanismo de transporte de ciertas proteínas y péptidos en su forma catiónica. La endocitosis por fluido de fase se ha

demostrado únicamente en cultivos celulares de BHE proveniente de humano y bovino.

El fluido de fármacos. Fármacos, nutrientes, metabolitos, péptidos, hormonas y neurotransmisores pueden ser transportados activamente del cerebro a la sangre para mantener la homeostasis cerebral. El transporte activo fuera del cerebro ocurre vía transportadores de transporte activo primario localizado en la BHE que incluyen a la glicoproteína-P, miembros de la familia de proteínas asociadas a una resistencia multifármacos, transportador de ácidos monocarboxílicos y transportadores de iones orgánicos. El transporte activo primario en la BHE ha mostrado ser una limitante en la penetración de compuestos terapéuticos como fármacos anti-VIH, analgésicos, antibacteriales, antiepilépticos y agentes anticancerígeno hacia el SNC [16].

La BHE posee una especial permeabilidad para diversos solutos, así, la razón entre las concentraciones LCR/plasma es inversamente proporcional al P.M. de las sustancias, un ejemplo de esto es la proporción entre el LCR y el plasma en el caso de la albúmina con P.M. de 69000 daltons, que es de 1/200 y existiendo relativamente más albúmina que gamma globulinas con P.M. de 15000 daltons.

Otros factores importantes son las propiedades físicas de los solutos, como: la liposolubilidad, su unión a proteínas plasmáticas y su grado de ionización a pH fisiológico. Los solutos hidrosolubles y polares atraviesan la BHE con dificultad a no ser que dispongan de transportadores especiales como en el caso de la glucosa y los aminoácidos.

La BHE posee una importante regulación osmótica siendo casi libre el peso del agua (el 93% de una sola inyección difunde al encéfalo), pero presentando una importante restricción al paso de los cationes como el sodio o el potasio, que a pesar de poseer transportadores específicos sólo logran el equilibrio con el plasma horas después de la inyección.

Otros factores implicados en la permeabilidad son la carga negativa del capilar cerebral (la albúmina catiónica pasa mejor que la neutra) y el sistema de transporte coroideo, ya que la relación entre el LCR y el líquido intersticial cerebral es muy estrecha. La BHE y el LCR actúan como un sistema que

mantiene la homeostasis del SNC, facilitando la entrada de los metabolitos necesarios e impidiendo su paso o facilitando la excreción de los innecesarios [17, 18, 19].

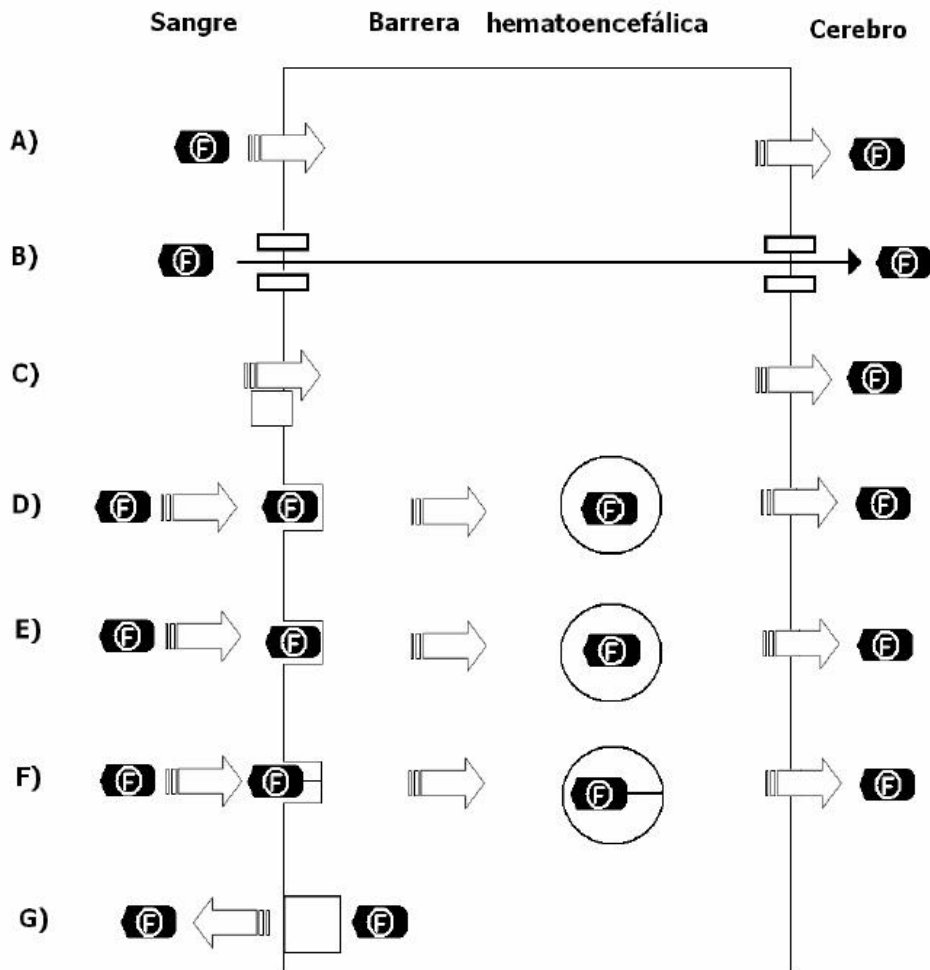


Fig 2: Mecanismo de transporte a través de la barrera hematoencefálica. (A) difusión transcelular; (B) difusión paracelular; (C) transporte mediado por acarreador; (D) endocitosis por fluido de fase; (E) endocitosis adsorptiva; (F) endocitosis mediada por receptor; y (G) transporte activo primario de fármaco [19]

II.2 Benzodiazepinas

Dentro de los fármacos que actúan sobre el sistema nervioso central (SNC), nos encontramos con dos grupos:

- a) Depresores del SNC.
 - Anestésicos generales
 - Sedantes
 - Hipnóticos
 - Neurolépticos (Tranquilizantes mayores) y Ansiolíticos (Tranquilizantes menores)
 - Anticonvulsivos
 - Analgésicos
 - Relajantes musculares
 - Antiparkinsonianos.
- b) Estimulantes del SNC.
 - Analépticos
 - Estimulantes cerebrales

Dentro de los fármacos depresores del SNC, encontramos el grupo de las benzodiazepinas. En general, las benzodiazepinas, son fármacos tranquilizantes menores, potentes (ansiolíticos) y también actúan como anticonvulsivos; además existen algunos que poseen actividad hipnótica. [20]

Los fármacos ansiolíticos como las benzodiazepinas, son depresores selectivos del SNC, que se usan en el tratamiento de trastornos mentales leves, tales como: neurosis y ansiedad, pueden actuar, además como relajantes musculares, además presentan algunas características de los fármacos sedantes, tales como, la disminución de la agresividad en los individuos, además de promover la sensación de relajación y bienestar, incrementan también la sociabilidad; regularmente este tipo de fármacos ocasionan tolerancia, así como dependencia tanto psíquica como física en los pacientes, pueden además producir síntomas de abstinencia. [20]

Este grupo de fármacos empezó a ser investigado en la década de los años 50, siendo el clordiazepóxido, la primera sustancia de este grupo al que se le descubrieron las propiedades antes mencionadas. [20]

Las benzodiazepinas son fármacos de origen sintético, en general, están formadas por un sistema anular heterocíclico formado por un anillo bencénico y un anillo heptagonal que contiene dos átomos de nitrógeno (Fig. 3). [20]

II.2.1 Clasificación de las Benzodiazepinas

1.- Clasificación de benzodiazepinas por su acción farmacológica.

En la actualidad, se cuenta con gran número de fármacos pertenecientes al grupo de benzodiazepinas, dentro de este grupo podemos encontrar que poseen diferentes características farmacológicas a pesar de su similitud química. [20]

2.- Clasificación de benzodiazepinas por la duración de su efecto.

Una forma de clasificar a este importante grupo de fármacos, es basándose en la duración de su efecto: como de larga duración, estos fármacos tienen un tiempo de vida media mayor a 20 horas; y los de corta duración, en donde encontramos que el efecto farmacológico es poco persistente ya que el tiempo de vida media de estos es menor a 20 horas, por lo que resultan útiles en pacientes que requieren mejorar el proceso de conciliación del sueño, además de que este tipo de fármacos se recomiendan en pacientes con enfermedades hepáticas, ya que al eliminarse rápidamente, reduce el conjunto de transformaciones metabólicas que el hígado lleva a cabo para convertir al fármaco administrado en una sustancia polar que pueda ser fácilmente eliminada por el riñón (regularmente) y de esta manera el hígado, que es el sitio principal donde se lleva a cabo la mayor parte de estas transformaciones metabólicas de los fármacos, no se vea afectado. [20]

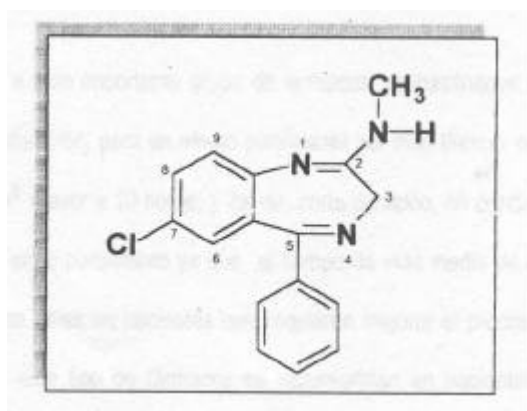


Fig 3 Representación estructural de la Benzodiazepina.

1,4-Benzodiazepina

7-COLORO-3-HIDRO-5-FENIL-2(N-METIL)AMINO-1,4-BENZODIAZEPINA [20]

Tabla 30. Benzodiazepinas; vida media, uso y dosis recomendada [21].

Benzodiazepinas	Vida media (en horas) [metabolito activo]	Objetivo de comercialización	Dosis oral equivalente aproximada (en mg)
Alprazolam (Xanax [®] , Alplax [®])	6-12	Ansiolítico	0.5
Bromazepam (Lexotanil [®])	10-20	Ansiolítico	5-6
Clordiazepóxido (Librium [®])	5-30 [36-200]	Ansiolítico	25
Clobazam (Frisium [®])	12-60	Ansiolítico, anticonvulsivo	20
Clonazepam (Clonopin [®] , Rivotril [®])	18-50	Ansiolítico, anticonvulsivo	0.5
Clorazepate (Tranxene [®] , Nansius [®])	[36-200]	Ansiolítico	15
Diazepam (Valium [®])	20-100 [36-200]	Ansiolítico	10
Estazolam (ProSom [®])	10-24	Hipnótico	1-2
Flunitrazepam (Rohipnol [®])	18-26 [36-200]	Hipnótico	1
Flurazepam (Dalmane [®])	[40-250]	Hipnótico	15-30
Halazepam (Paxipam [®] , Alapryl [®])	[30-100]	Ansiolítico	20
Ketazolam (Anxon [®])	2	Ansiolítico	15-30
Loprazolam (Somnovit [®])	6-12	Hipnótico	1-2
Lorazepam (Ativan [®])	10-20	Ansiolítico	1
Lormetazepam (Noctamid [®] , Loramet [®])	10-12	Hipnótico	1-2
Medazepam (Nobrium [®])	36-200	Ansiolítico	10
Nitrazepam (Mogadon [®])	15-38	Hipnótico	10
Nordazepam (Nordaz [®])	36-200	Ansiolítico	10
Oxazepam (Serax [®] , Serenid [®] , Serepax [®])	4-15	Ansiolítico	20

II.2.2 Mecanismo de acción de las Benzodiazepinas

El mecanismo de acción farmacológico que utilizan las benzodiazepinas está relacionado con la función de los sistemas neuronales cerebrales que utilizan el GABA como neurotransmisor. [22]. Esta sustancia, la cual ejerce influencia de tipo inhibitor, provoca una hiperpolarización celular, la cual se traduce como un estado de hipoexcitabilidad neuronal [22]. Estos efectos son resultado de la unión del GABA a sus receptores específicos cerebrales. El receptor GABA es una proteína pentamérica de la cual 3 subunidades son las que están completamente identificadas las cuales son: α , β y γ y el receptor actúa como un canal del ión cloro.

Actualmente se han descrito dos tipos de receptores al GABA, los receptores GABA_A, los cuales son sensibles a la bicuculina y están acoplados al ionoforo del ion Cl⁻, y los receptores GABA_B los cuales son insensibles a bicuculina y actúan a través de los canales de los iones Ca⁺⁺ y K⁺[23]. Los efectos provocados por las benzodiazepinas, son mediados básicamente por los receptores GABA_A. El receptor GABA_A se encuentra cerrado cuando no está unido a GABA o a las benzodiazepinas. En respuesta a GABA el cual se une a la subunidad α el canal se abre para permitir la entrada de iones cloruro dentro de la célula, la conductancia mediada por el ion cloruro es incrementada cuando la benzodiazepina se une a la subunidad γ . [11].

Los estudios realizados a lo largo de este tiempo para llegar a conocer el mecanismo de acción de los fármacos pertenecientes al grupo de las benzodiazepinas, han revelado que estos, facilitan el efecto inhibitor de la neurotransmisión que está mediada por GABA. Dicho mecanismo es activado por una modulación alostérica positiva de los receptores GABA_A Los cuales regulan el paso del Cl⁻ en la membrana postsináptica de las neuronas blanco pero no altera el tiempo de apertura de los canales, ni el tiempo de conductancia. [20]

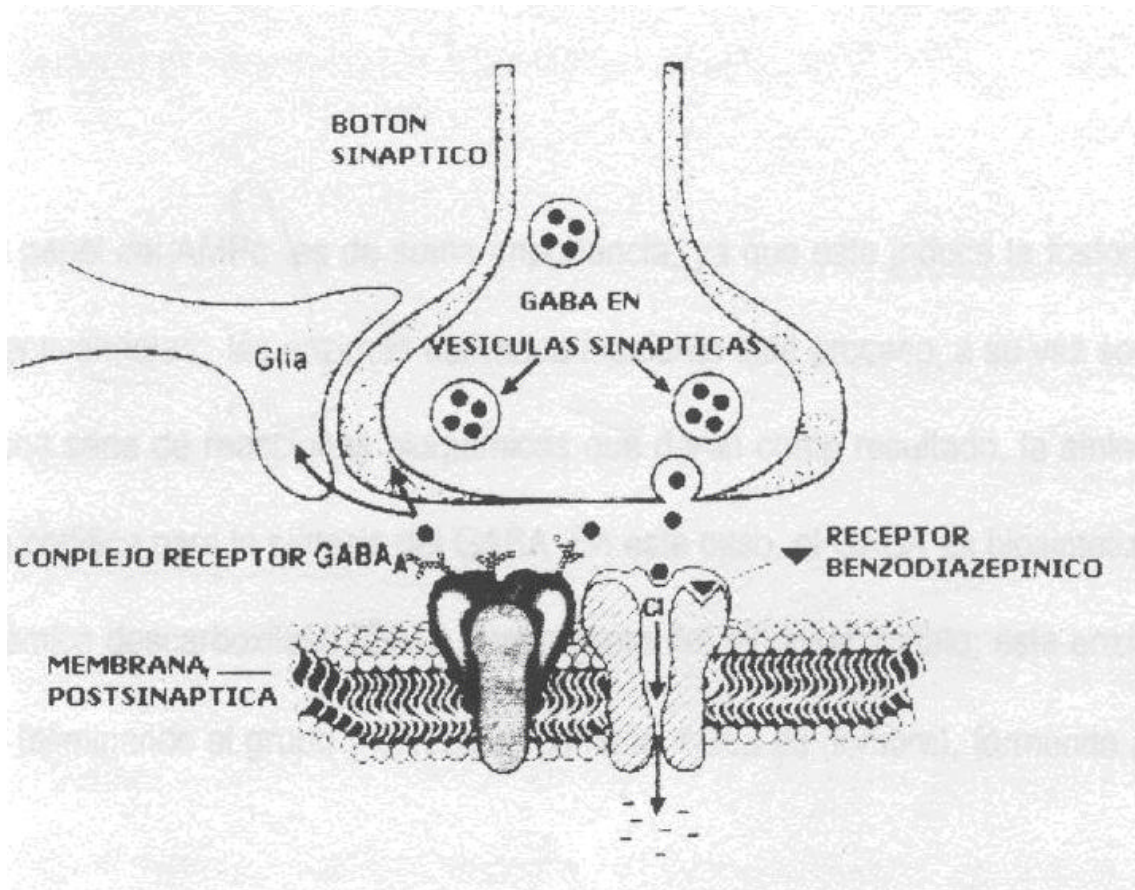


Fig. 4 Supercomplejo del receptor GABA/ionóforo de Cl^- donde se esquematiza, la función de las benzodiazepinas, aumentando la afinidad del neurotransmisor GABA por su receptor, facilitando así el paso de los iones Cl^- hacia el interior de la célula. [20]

El mensaje que el GABA transmite es un mensaje de inhibición: le comunica a las neuronas con las que se pone en contacto que disminuyan la velocidad o que dejen de transmitir. Como más o menos el 40% de los 100000 millones de neuronas del cerebro responden al GABA, esto significa que el GABA tiene un efecto general tranquilizante en el cerebro: de cierta forma, es el hipnótico y tranquilizante natural con que cuenta el organismo. Las benzodiazepinas aumentan esta acción natural del GABA, ejerciendo de esta forma una acción adicional (frecuentemente excesiva) de inhibición en las neuronas.

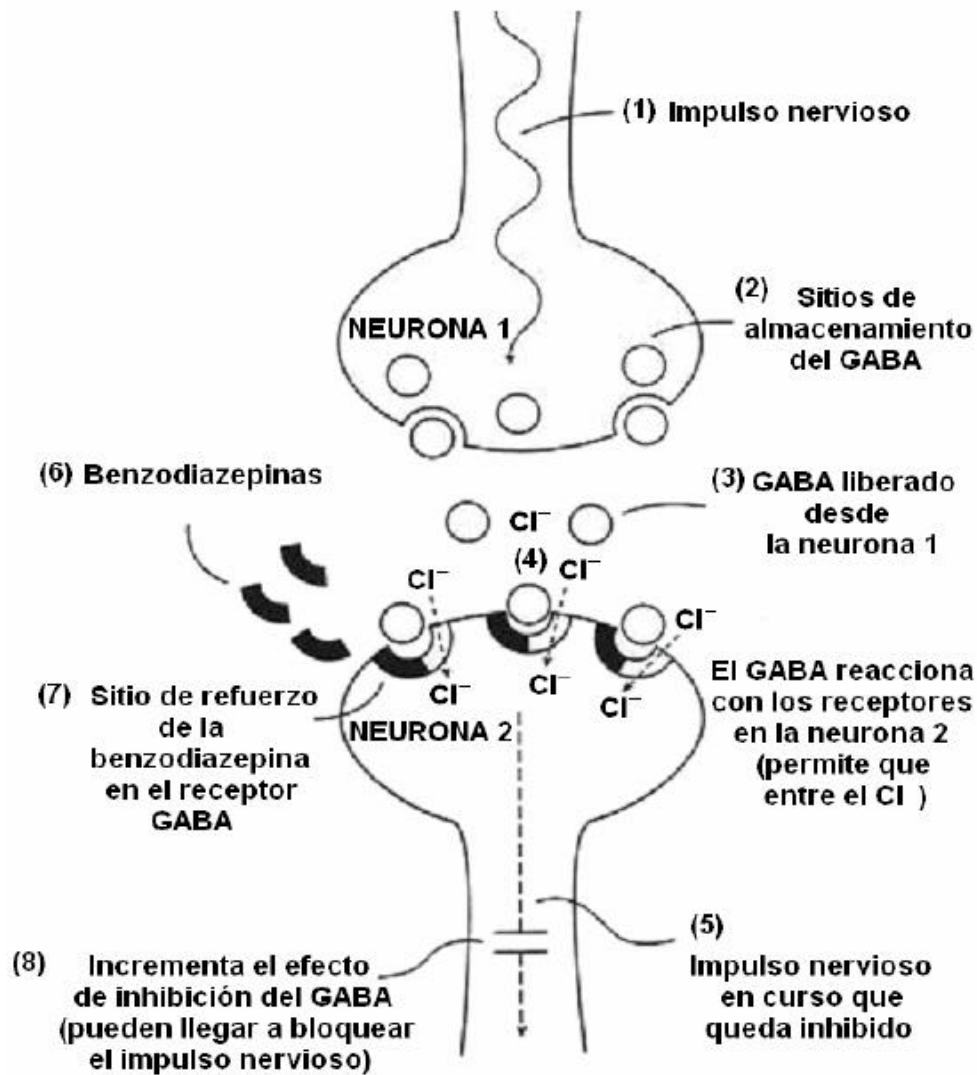


Fig. 5. Mecanismo de acción de las benzodiazepinas. [8]

1. Impulso nervioso.
- 2.- El anterior impulso nervioso hace que el GABA sea liberado de los sitios en que está almacenado en la neurona.
- 3.- El GABA es liberado en el espacio interneuronal.
- 4.- El GABA reacciona con los receptores de la neurona, la reacción permite la entrada de los iones cloruro (Cl⁻) en la neurona.
- 5.- El efecto anterior inhibe o detiene el progreso del impulso nervioso.
- 6.- Administración de benzodiazepina.
- 7.- Las benzodiazepinas reaccionan con el sitio de refuerzo de los receptores GABA.

8.- esta acción aumenta los efectos inhibidores del GABA; el impulso nervioso en curso puede quedar bloqueado completamente. [24]

La interacción del clonazepam con los receptores GABA ubicados en la parte exterior de la neurona que lo recibe abre un canal, permitiendo así que las partículas con carga negativa (iones de cloruro) entren en la neurona. Estos iones negativos "sobrecargan" la neurona, debilitando la respuesta de la misma a otros neurotransmisores que en condiciones normales, la excitarían.

Las benzodiazepinas también reaccionan en sus propios sitios especiales (receptores benzodiazepínicos) que precisamente están ubicados en los receptores GABA. La combinación de una benzodiazepina con su receptor potencia la acción del GABA, lo cual permite que entre en las neuronas una mayor cantidad de iones de cloruro, aumentando así la resistencia de la neurona a la excitación. Los distintos subtipos de receptores benzodiazepínicos tienen acciones levemente distintas. Todas las benzodiazepinas, en mayor o menor grado, con todos los subtipos y todas aumentan la actividad del GABA en el cerebro.

Como resultado de este incremento de la actividad inhibidora del GABA causada por las benzodiazepinas, disminuye la producción cerebral de neurotransmisores excitativos, incluso se reduce la producción de norepinefrina (noradrenalina), serotonina, acetilcolina y dopamina. Estos neurotransmisores excitativos son necesarios para las funciones involucradas en el estado normal de vigilia, alerta, memoria, tono muscular, coordinación, respuestas emocionales, secreción de las glándulas endocrinas, control del ritmo cardiaco, de la tensión sanguínea y para muchas otras funciones , todas las cuales pueden ser perjudicadas por las benzodiazepinas.

Hay otros receptores benzodiazepínicos, no relacionados con el GABA, que se encuentran en el riñón, colon, células sanguíneas y corteza suprarrenal, y que pueden ser afectados por algunas benzodiazepinas. Estos efectos directos e indirectos son responsables de los bien condicionados efectos adversos causados por el uso de este grupo de fármacos. [24]

II.2.3 Farmacocinética

Las propiedades físico-químicas y farmacocinéticas de las benzodiazepinas influyen mucho sobre su utilidad clínica.

Todas las benzodiazepinas son bases orgánicas débiles, son muy liposolubles y se absorben rápido y completamente por vía oral, salvo el clorazepato que es un profármaco y se descarboxila rápidamente en el jugo gástrico a N-desmetildiazepam (nordiazepam) y luego se absorbe por completo. El midazolam es el compuesto más liposoluble y el flumazenil el menos liposoluble. La absorción por vía IM es irregular, en caso de ser necesaria la vía parenteral, la de elección es la IV, generalmente, el solvente que poseen es el polietilenglicol, es un polialcohol muy irritante que hace precipitar la benzodiazepina en el tejido muscular y por lo tanto se absorbe mal el fármaco. En caso de elegirse la vía IM, el músculo que se prefiere es el deltoides y la inyección debe ser profunda para evitar pérdida de biodisponibilidad en el tejido adiposo. El lorazepam es la única benzodiazepina que se absorbe completamente por vía IM, cuando se administran por vía oral a los 30min. aparecen los efectos ansiolíticos o hipnóticos. Como vimos, son muy lipofílicas, el comienzo de acción después de una dosis oral refleja el grado de absorción gastrointestinal (aproximadamente 30 min.); la duración de acción demuestra el porcentaje de distribución en tejidos periféricos, el grado de unión a proteínas plasmáticas y el porcentaje de depuración y eliminación. [25]

Las benzodiazepinas son transportadas por la circulación sistémica a la circulación cerebral capilar, estos agentes tienen alto grado de unión a proteínas plasmáticas 80-95%, albúmina principalmente y debido a su escasa fracción libre pasan poco al líquido cefalorraquídeo. La benzodiazepina más soluble es el diazepam, es por ello que atraviesa rápidamente la barrera hematoencefálica, realiza un rápido equilibrio entre la sangre y el tejido cerebral y se concentra en este último. [25]

Otras benzodiazepinas menos liposolubles como el lorazepam difunden con menor extensión y rapidez al cerebro, aunque finalmente (aprox.30 min.) se logra el equilibrio entre la sangre y el cerebro. Como sabemos, sólo la fracción

libre es farmacológicamente activa y es la que difunde a través de las membranas biológicas. La alta unión a proteínas plasmáticas también influencia en la cantidad de fármaco captado por el cerebro, así la concentración de fármaco libre en plasma refleja la concentración cerebral. [25]

El volumen de distribución aparente es amplio (1-2 litros/Kg.), debido a que estos fármacos luego de concentrarse en el cerebro sufren una redistribución tisular periférica sobre todo en lípidos y músculo. [25]

En general las benzodiazepinas son *metabolizadas* primariamente por enzimas microsomales hepáticas, sufriendo oxidación microsomal (fase I) y luego glucuronoconjugación (fase II). A diferencia de los barbitúricos no son potentes inductores enzimáticos hepáticos. La mayoría de las benzodiazepinas deben ser primero oxidadas (metabolitos activos, fase I) y luego conjugadas (metabolitos inactivos, fase II). [25]

Los metabolitos oxidados son activos y pueden ligarse o unirse al receptor de benzodiazepinas (aunque en general poseen menos actividad que el fármaco madre). [25]

Los metabolitos glucuronoconjugados son inactivos y se excretan con facilidad. Los ancianos tienen disminuidos: la masa hepática, el flujo hepático, la oxidación, la reducción y la hidrólisis; esto hace que la fase I se demore y se acumule fármaco activo y metabolitos activos. De este modo aumentan los niveles plasmáticos de la benzodiazepina y por lo tanto aumentan los efectos adversos. La glucuronación, sulfatación y acetilación no están afectadas en ancianos (fase II). [25]

Algunas benzodiazepinas como flurazepam (Somlan) poseen una vida media corta (1-3 hs), sin embargo su metabolito oxidado el desalkilflurazepam circula en plasma por más de 50 hs., si las dosis son repetidas, se acumulan pudiendo producir efectos depresores no deseados, como por ejemplo sedación matinal. [25]

Otros agentes de vida media más larga producen metabolitos que circulan por más de 200 horas en plasma como el metabolito Ndesmetildiazepam, o el

metabolito oxazepam que circula en plasma 24 hs. Cuando se utilizan benzodiazepinas de vida media más larga, las dosis repetidas se acumulan pudiendo producir sedación, pero no aparece el insomnio rebote.

El triazolam que es un agente de vida media corta, no produce metabolitos activos, esto podría asociarse al insomnio rebote, con ansiedad, agitación, amnesia, disturbios afectivos, sonambulismo cuando son retirados bruscamente. Esto sería un síndrome de abstinencia severo y de rápida instalación. [25]

La oxidación de las benzodiazepinas podría estar comprometida en ancianos o en hepatopatías, trayendo como consecuencia acumulación de benzodiazepinas, sus metabolitos y prolongación de la vida media. Lo mismo puede ocurrir con la administración conjunta con cimetidina, estrógenos, disulfiram, eritromicina, isoniacida que compiten con las mismas enzimas microsomales para la biotransformación, pudiendo acumular las benzodiazepinas. [25]

En pacientes con cirrosis, enfermedad hepática avanzada, ancianos o pacientes tratados con otros fármacos, no se afecta la actividad enzimática de fase II. En estos casos especiales se puede administrar oxazepam (Nesontil), temazepam (Lenal) o lorazepam (Trapax), los cuales son metabolizados exclusivamente por conjugación, teniendo especial cuidado con el lorazepam, sobre todo en ancianos por la alta incidencia de amnesia y confusión mental que produce. Podemos decir que las benzodiazepinas de acción intermedia y prolongada son más susceptibles de acumulación y son las que necesitan mayores ajustes de las dosis y/o intervalos entre las mismas en hepáticos y ancianos. [25]

Las benzodiazepinas atraviesan con facilidad la placenta y son capaces de producir efectos depresores en el feto y/o teratogenicidad del comportamiento. Se excretan por la leche materna en un 10-15% de la concentración plasmática, lo cual puede producir sedación en el lactante. La leche de vaca (también la leche en polvo) contienen N-desmetildiazepam, debido a que el diazepam se encuentra en algunos hongos y vegetales (trigo, papas). [25]

La *eliminación* se realiza por filtración y secreción tubular principalmente metabolitos glucuronoconjugados y en menor cantidad los oxidados. [25]

II.2.4 Clonazepam

Benzodiazepina introducida en 1975 usada casi exclusivamente como un anticonvulsivo, para prevenir y tratar los ataques epilépticos. Se muestra en la figura 6 muestra su estructura química, (5-(2-clorofenil)-1,3-dihidro-7-nitro-2H-1,4-benzodiazepina-2-ona) es un derivado clorado del nitrazepam en la posición 2 del anillo C. (Fig. 6). [10]

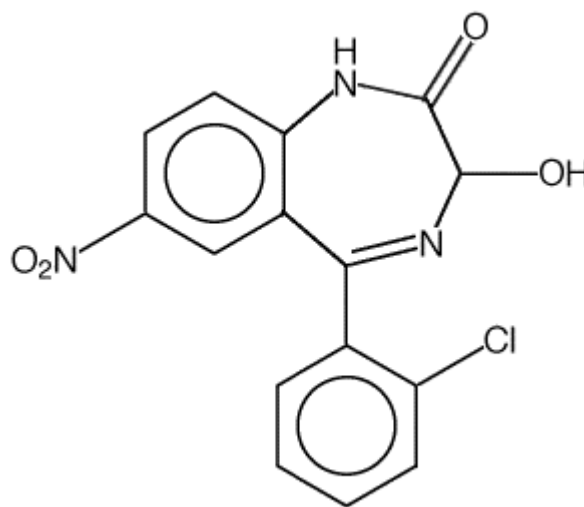


Fig. 6 Estructura del Clonazepam [24]

El Clonazepam posee todos los efectos farmacológicos característicos de las benzodiazepinas: ansiolítico, sedante y miorelajante. Sin embargo su utilidad queda limitada porque con frecuencia causa sedación y ataxia. Se puede usar en casos de epilepsia de ausencia, pero debido a sus efectos adversos, por lo regular se reserva su empleo a otras formas de epilepsia infantil farmacoresistente. Con la administración crónica de éste fármaco para controlar convulsiones excesivas, se puede desarrollar tolerancia a los efectos antidepressivos del SNC así como el efecto anticonvulsivo. [10]

El clonazepam es seguro, de vida media larga y no causa trastornos gastrointestinales importantes y efectos que hagan peligrar la vida.

Causa sedación o cambios de personalidad (excitación paradójica) hasta en 50% de los pacientes que lo toman. En los niños, la excitación paradójica puede tomar la forma de impaciencia, rudeza o agresión franca. Lo mismo que otras benzodiazepinas, sus efectos depresivos sobre el SNC se incrementan con el consumo de alcohol, opioides y diversos fármacos sedantes e hipnóticos. [10]

Su efecto anticonvulsivo, puede desaparecer después de algunos meses de uso ya que el uso prolongado de este fármaco crea tolerancia. [10]

II.2.5 Mecanismo de acción de Clonazepam

Potencia la inhibición mediada por GABA al fijarse en el sitio receptor de las benzodiazepinas en los canales de cloruro con puerta de ligando, relacionados con los receptores de GABA_A (ver mecanismo de acción de las benzodiazepinas). [10]

II.2.6 Posología

La dosis de clonazepam debe adaptarse en forma individual para cada paciente de acuerdo a la respuesta clínica y tolerancia. La dosis de mantenimiento será alcanzada luego de un ajuste posológico progresivo, con objeto de prevenir los efectos adversos al iniciar el tratamiento; se alcanza habitualmente en el curso de 1 a 3 semanas. Se recomienda fraccionar la dosis diaria en dos o tres tomas durante el periodo de ajuste. Una vez alcanzada la dosis de mantenimiento, la misma puede ingerirse en una sola toma al acostarse. Si fuesen necesarias varias tomas diarias se recomienda ingerir la dosis mayor al acostarse. [10]

Actividad anticonvulsiva.

Adultos: la dosis inicial recomendada es de 1 a 2 mg/día, la que será incrementada entre 0.5 a 1mg cada 3 días hasta alcanzar la dosis de mantenimiento. La dosis habitual es de 2 a 4 mg/día y la máxima de 20 mg/día.

Niños: la dosis inicial para niños de 10 a 16 años o con más de 30Kg es similar a la de los adultos (1 a 2 mg/día) y la dosis habitual recomendada de 1.5 a 3 mg/día.[10]

Si el clonazepam se utiliza como terapéutica asociada a otros anticonvulsivantes habría que adaptar la dosis de cada fármaco a fin de obtener el efecto deseado. [10]

Trastorno de pánico, ansiedad generalizada y/o agorafobia.

La dosis debe ajustarse a cada caso particular, recomendándose iniciar con 0.5-1 mg/día en 1 o 2 tomas diarias, hasta alcanzar la dosis efectiva tolerable. La experiencia clínica demuestra un rango posológico de 1 a 5mgdiarios. [10]

II.2.7 Farmacocinética

- *Absorción:* Después de la administración oral de clonazepam, se absorbe en forma rápida y total. Las concentraciones plasmáticas máximas se registran en la mayoría de los casos al cabo de 1-4 horas de la toma del medicamento. La biodisponibilidad por vía oral es del 90%. Tras la administración diaria de 6 mg (divididos en 3 dosis diarias), las concentraciones plasmáticas en estado de equilibrio oscilan entre 25 y 75 ng/ml. Las concentraciones plasmáticas en estado de equilibrio después de la administración de dosis repetidas pueden llegar a ser cuatro veces (dosis única diaria) u ocho veces (tres dosis diarias) superiores a las observadas tras la administración de una sola dosis. El efecto óptimo se obtiene con concentraciones plasmáticas de clonazepam de 20-70 ng/ml (promedio: 55 ng/ml, aproximadamente). [26]
- *Distribución:* El volumen medio de distribución de clonazepam se calcula en unos 3 l/Kg. Su grado de fijación a proteínas es del 85%. Se puede estimar que clonazepam atraviesa la barrera placentaria, y se ha detectado su presencia en la leche materna. [26]

- *Metabolismo:* La transformación metabólica de clonazepam se produce por hidroxilación oxidativa y reducción del grupo 7-nitro, con formación de compuestos 7-amino o 7-acetilamino, que pueden conjugarse para formar nuevos metabolitos. El principal metabolito es 7-amino-clonazepam, con escasa actividad anticonvulsivante. Se han identificado, además, otros cuatro metabolitos, pero en menor proporción.[26]
En un plazo de 4-10 días, se elimina por la orina el 50-70% de la radiactividad total de una dosis oral de clonazepam marcado y por las heces, el 10-30%, casi exclusivamente en forma de metabolitos libres o conjugados. Menos del 0,5% se recupera en la orina en forma de clonazepam inalterado. [26]
- *Eliminación:* La vida media de eliminación oscila entre 20 y 60 horas (promedio: 30 horas). [26]

II.3 Estudios sobre la ansiedad con animales

El miedo es una reacción natural que ocurre cuando hay alguna amenaza o peligro. El miedo involucra ciertas alteraciones neuroquímicas en el funcionamiento de diversas estructuras cerebrales. En los seres humanos, se caracteriza por producir cambios motores, irritabilidad, agresión o vigilancia exacerbada. A veces el miedo llega a convertirse en una patología conocida como ansiedad; en estos casos, el peligro puede ser real o irreal, e incluso estímulos irrelevantes pueden desencadenar el trastorno. [27]

Por otro lado, los animales pueden exhibir algunas respuestas de miedo que dependen de la estructura cerebral que es estimulada por el tipo de situación peligrosa. En ocasiones, tienden a permanecer completamente inmóviles, y de esta manera pasan desapercibidos; en otras, deciden escapar del riesgo; no obstante, sólo muy pocas veces llegan a enfrentar el peligro, lo que hacen sobre todo cuando el escape es imposible. [27]

En los animales no se puede hablar de ansiedad sino de miedo, de manera que para estudiar la ansiedad en los seres humanos se debe recurrir a

modelos animales que ilustren algunos aspectos de la psicopatología de los seres humanos. La ventaja de utilizar modelos de ansiedad con animales es que se pueden ensayar en ellos diversas técnicas experimentales que en los seres humanos sería imposible. A pesar de que las reacciones de miedo entre animales y seres humanos comparten algunos aspectos estructurales, la actividad de los segundos es infinitamente más compleja, de tal forma que el estudio con animales de laboratorio sólo permite hacer algunas aproximaciones, lo que es la mayor desventaja de dichos modelos. [28]

Existen más de treinta modelos animales diseñados para estudiar la amplia gama que comprenden los desórdenes de ansiedad. Tales modelos se pueden dividir en dos grandes grupos: los modelos basados en respuestas incondicionadas y los que se fundamentan en respuestas condicionadas. [28]

II.3.1 Modelos basados en respuestas incondicionadas

Los modelos basados en respuestas incondicionadas emplean la curiosidad natural de los animales de laboratorio, la que los lleva a explorar. Por ejemplo, el modelo Plus Maze donde se ponen a ratas de laboratorio en un aparato que tiene cuatro brazos formando una cruz y que se encuentra elevado del piso. Dos brazos opuestos de ese laberinto tienen paredes protectoras, no así los dos brazos opuestos. En esta prueba, los roedores son colocados en el punto en que los brazos se cruzan y se les permite explorar de forma libre los cuatro brazos. Inicialmente, y siguiendo su instinto de exploración, los animales incursionan en los cuatro brazos, y descubren que en ellos existen dos peligros: uno es la altura a la que se halla el laberinto del suelo y otro es el espacio abierto, de suerte que, después de algunos segundos, evitan definitivamente la exploración de los brazos abiertos y permanecen el resto del tiempo en los brazos que tienen pared. Pese a ello, la aplicación de fármacos que se utilizan para disminuir la ansiedad (o ansiolíticos) propician la exploración constante de los brazos abiertos. [27]

Pero esta prueba, como todos los modelos animales, tiene limitantes. Por ejemplo, es una prueba que sólo se puede realizar una sola vez, ya que los roedores desarrollan ansiedad permanente y no responden a los tratamientos

ansiolíticos en una nueva exposición, además de que no todos los fármacos ansiolíticos producen efecto en ratones. Además, su utilidad permite demostrar los efectos ansiolíticos o ansiogénicos de diversos fármacos, así como de plantas medicinales que tienen reputación popular de ser medicinales. Asimismo, se puede explorar el papel que algunas estructuras cerebrales tienen en el miedo y la ansiedad; por ejemplo, la estimulación del hipocampo produce un incremento de la ansiedad. [27]

Otras pruebas basadas en la exploración son la de exploración libre, de ansiedad graduada, del tablero con hoyos, de luz-oscuridad, del campo abierto y otras. En todos estos modelos los investigadores deben estudiar diversas variables, como la locomoción, la conducta vertical, la limpieza, la producción de bolos fecales y demás. Un modelo que se encuentra en auge es el de la interacción social. En este modelo se estudia el efecto de la dominancia de los machos sobre los animales subordinados, al tiempo que se ensayan los fármacos ansiolíticos. [28]

II.3.2 Modelos basados en respuestas condicionadas

Los modelos basados en respuestas condicionadas incluyen los de conflicto, entre los cuales se hallan el modelo de Geller-Seifter, el de Vogel, y las pruebas de conflicto. En tales modelos se emplean cajas de experimentación en las que se somete a los animales a la privación de algunos satisfactores, como agua o alimento. Los animales, al estar privados de esos satisfactores, los buscan ávidamente. El satisfactor se proporciona, pero asociado a la aplicación de descargas eléctricas, lo que se hace de acuerdo con las reglas éticas para el manejo de animales de laboratorio; cuando el animal de laboratorio llega al satisfactor, recibe una suave descarga eléctrica. Esto crea en los animales un conflicto: acceder al satisfactor, pero recibiendo una descarga eléctrica que, aunque suave, no deja de incomodarlos, o bien no acceder a aquél. Por lo general, los animales hacen esto último; aun así, los fármacos ansiolíticos disminuyen el miedo de los roedores, por lo que acceden al satisfactor a pesar de recibir la descarga eléctrica. [27]

Existe un modelo animal de conflicto en el cual las ratas son entrenadas para darse a sí mismas el satisfactor mediante el accionar de palancas. Los roedores tienen dos opciones: a) accionar una palanca y obtener el reforzador de forma inmediata, pero asociado a una ligera descarga eléctrica, o b) accionar otra palanca durante ocho veces para recibir un satisfactor, pero sin recibir la descarga. En otras palabras, una palanca exige poco trabajo para administrar el satisfactor pero produce un castigo, y la otra implica un mayor trabajo para acceder al satisfactor, pero sin que haya el riesgo de recibir la descarga. Es, pues, una clara situación de conflicto. Usualmente, los animales eligen la segunda opción. Los fármacos ansiolíticos, algunas plantas medicinales y las hormonas esteroides cambian la conducta de los roedores, y estos deciden entonces acceder al satisfactor asociado al castigo. [27]

En síntesis, los trastornos de ansiedad son alteraciones cada vez más frecuentes, y se aprecia un aumento significativo en la proporción de jóvenes que padecen ansiedad. Para estudiar este padecimiento, se han generado diversos modelos de ansiedad en los que se emplean animales de laboratorio. Existen algunos límites en los modelos de ansiedad empleados con animales, pero su estudio hace posible realizar algunas aproximaciones que en los seres humanos son imposibles por razones éticas. Los modelos que utilizan animales permiten ensayar fármacos con acciones potenciales como ansiolíticos, plantas con reputación popular de ser medicinales y hormonas, entre otros. Asimismo, se puede estudiar la participación de diversas estructuras cerebrales en este padecimiento gracias a los experimentos que se llevan a cabo con animales. [27]

II.4 Modelos: Plus Maze Elevado y Prueba de Tracción

Consiste en un modelo de madera que es conformado por dos brazos abiertos (de 30 centímetros de largo x de 5 centímetros de ancho) y dos brazos cerrados (de iguales dimensiones) extendidos en una plataforma central (de 5 x 5 centímetros) y elevado a una altura de 45 centímetros sobre el piso. (Fig. 7) El ratón se colocan individualmente en el centro del laberinto de tal manera que su cabeza mire hacia un brazo abierto y se registra durante un período de la observación de 5 minutos el número de entradas y del tiempo en brazos cerrados y abiertos. [29, 30, .31]

Este laberinto es comúnmente utilizado para determinar un comportamiento de ansiedad en roedores. La seguridad es proporcionada por los brazos cerrados, mientras que los brazos abiertos ofrecen valor exploratorio por lo tanto, uno puede esperar que los roedores ansiosos pasen menos tiempo en los brazos abiertos que los que son menos temerosos [32].

Cuando se coloca un roedor en el Plus Maze por primera vez, su comportamiento se basa en gran parte en su nivel de ansiedad, los roedores normales que no han sido administrados con un fármaco contra la ansiedad llegarán a ser moderadamente ansiosos en este nuevo ambiente. Así, tienden a preferir los brazos cerrados en lugar de los abiertos (menos seguros) [32]. Mientras tanto los roedores tratados con el fármaco contra la ansiedad (ej: diazepam, conocido como valium) tienden a ser menos ansiosos, así que ellos pasan más tiempo en los brazos abiertos en comparación con los roedores no administrados [33], y ellos son generalmente menos activos. Los investigadores postulan que los roedores administrados han aumentado niveles de ansiedad [34]. Estos demuestran una actividad mas alta en brazos abiertos que los normales (es decir, más entradas en los brazos abiertos y más tiempo de permanencia en estos.) y exhiben a veces comportamientos extremos como saltar al piso desde los brazos abiertos [35], porque los ratones que saltan desde los brazos abiertos parecen intentar escaparse, esto se refiere como comportamiento del escape.

Actualmente los investigadores que prueban compuestos diseñados para disminuir niveles de ansiedad ensayan en el Plus Maze con dos sistemas tratados. Un grupo es administrado con el tratamiento anti ansiedad, mientras que el grupo control recibe un placebo.

Hay muchos factores que afectan el comportamiento de los roedores en el modelo Plus Maze incluyendo el nivel de iluminación a la que son expuestos, los sonidos y los olores que están presentes durante la prueba [36] puesto que existen pequeñas variaciones en la manera en la que los investigadores tratan a sus animales un modelo ajustado en un laboratorio no puede ser apropiado para otro aunque no sería difícil ajustar los modelos para compensar las diferencias en un nuevo ambiente de prueba.

II.4.1 Comportamiento de los roedores en el Plus Maze

Los animales pasan mucho del tiempo permaneciendo o moviéndose en el modelo de una parte a otra. Otro comportamiento común comprende levantarse sobre los brazos cerrados para examinar las paredes y observar hacia los brazos abiertos. Estas actividades son similares porque ambas implican el exploramiento de los brazos. Según lo mencionado anteriormente los roedores adoptan en algunos casos la conducta del escape intentando saltar de los brazos abiertos. Otra actividad común es la evaluación de riesgo, la evaluación de riesgo se refiere a posturas de estiramiento y a mirar fijamente los brazos abiertos.

Un roedor decidirá si un brazo abierto es menos seguro que otro lugar del laberinto. Puede ser que haga esto empujando su cabeza hacia fuera sobre ese brazo mientras se encuentra parado sobre el borde de un brazo cerrado. Los roedores también captan este tipo de riesgos mientras están parados con seguridad en el centro del laberinto. Sería imposible predecir los movimientos y el comportamiento de cada roedor porque todos se comportan de manera distinta en el Plus Maze. Por lo tanto los investigadores han tomado varias medidas que son indicativas del comportamiento total de un roedor mientras explora el laberinto. Estos incluyen el porcentaje del tiempo pasado en los

brazos abiertos, el porcentaje pasado en los brazos cerrados y en el centro. Uno puede contar con que un roedor tratado con un fármaco contra la ansiedad tenga un porcentaje más alto del tiempo pasado en los brazos abiertos que un roedor normal. Otras medidas importantes son el cociente de las entradas en brazos abiertos y cerrados de las entradas totales. Estas medidas pueden ayudar en la determinación del nivel de ansiedad de un roedor indicando cualquier preferencia por un tipo de brazo siguiente del centro del laberinto [37].



Fig. 7 Modelo de "Elevated Plus-Maze" Lister, 1987[38]

II.4.2 Modelo de Tracción.

El modelo de Tracción está conformado por un alambre de 30 cm. de largo sujetado de dos soportes de madera paralelos de 25 cm. c/u, dicho alambre se encuentra tenso y suspendido de forma horizontal a una altura de 20 cm.

La prueba consiste en acercar las patas delanteras del ratón al alambre y medir el tiempo en que el sube sus patas traseras, si el tiempo es mayor a 10 segundos se dice que el efecto de la benzodiazepina rebasó la dosis indicada y el ratón se encuentra en la fase de relajación muscular [39].

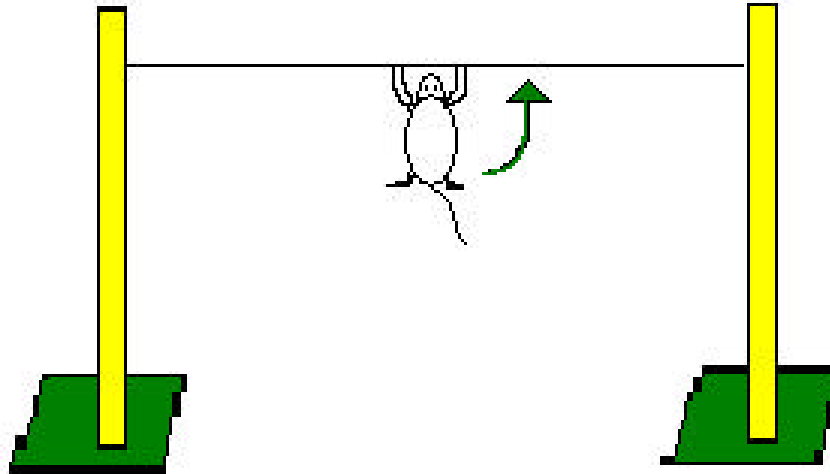


Fig. 8 Modelo de Tracción

II.5 NANOTECNOLOGIA.

La nanotecnología es un conjunto de técnicas que se utilizan para manipular la materia a la escala de átomos y moléculas. Nano es un prefijo que indica una medida, no un objeto. A diferencia de la biotecnología, donde "bio" indica que se manipula la vida, la nanotecnología habla solamente de una escala. [40]

Las nanotecnologías prometen beneficios de todo tipo, desde aplicaciones médicas nuevas o más eficientes a soluciones de problemas ambientales y muchos otros; sin embargo, el concepto de nanotecnología aún no es muy conocido en la sociedad.

Un nanómetro es la millonésima parte de un milímetro. Para comprender el potencial de esta tecnología es clave saber que las propiedades físicas y químicas de la materia cambian a escala nanométrica, lo cual se denomina efecto cuántico. La conductividad eléctrica, el color, la resistencia, la elasticidad, la reactividad, entre otras propiedades, se comportan de manera diferente que en los mismos elementos a mayor escala.[40]

Algunos países en vías de desarrollo ya destinan importantes recursos a la investigación en nanotecnología. La nanomedicina es una de las áreas que

más puede contribuir al avance sostenible del Tercer Mundo, proporcionando nuevos métodos de diagnóstico y cribaje de enfermedades, mejores sistemas para la administración de fármacos y herramientas para la monitorización de algunos parámetros biológicos [40].

La FDA llama nanotecnología a aquello que está involucrado en todo lo siguiente: Investigación y desarrollo de tecnología a nivel atómico, moléculas o macromoléculas, en un rango de longitud de escala de aproximadamente 1-100 nanómetros.

La investigación en nanotecnología provee una comprensión fundamental de materiales y fenómenos, que facilitan la creación y uso de estructuras, dispositivos y sistemas que tienen propiedades y funciones nuevas debido a su tamaño extremadamente pequeño [41].

II.5.1 Transportadores Submicrónicos de Fármacos. (TSF)

La mayoría de los fármacos existentes y candidatos a fármacos tienen una pobre solubilidad en fluidos biológicos, lo cual da como resultado una biodisponibilidad baja y altamente variable. En algunos casos la inyección intravenosa de estos fármacos no es posible por su baja solubilidad. Una de las mejores soluciones para resolver este tipo de problemas es utilizar tecnologías de formulación apropiadas. Diversos grupos de investigación que se encuentran a la vanguardia del nuevo conocimiento en beneficio de la salud humana se han enfocado en el desarrollo de TSF. [42]

Los TSF son solamente definidos por su tamaño (menor a $1\mu\text{m}$; aunque otros grupos establecen como límite $0.5\mu\text{m}$), son muy heterogéneos en muchos aspectos (estabilidad termodinámica, composición química y el estado físico, incluyendo sólidos, líquidos, o dispersiones cristalinas líquidas) y los ejemplos más prominentes son nanopartículas, nanoemulsiones, nanocapsulas, liposomas, nanosuspensiones, micelas, microemulsiones, y cubosomas. [42]

El principal objetivo de los TSF se relaciona con:

- Incremento en el transporte de fármaco.
- Posibilidad de liberación controlada.
- Posibilidad de entrega en el sitio blanco.
- Incremento de la factibilidad de la producción a gran escala.
- Incremento en la estabilidad física y química de almacenaje.
- Minimizar por completo los costos.

Los transportadores coloidales han atraído una mayor atención durante los últimos años, los sistemas investigados incluyen nanopartículas, nanoemulsiones, liposomas, nanosuspensiones y micelas. La existencia de diferentes sistemas de transportadores coloidales plantea preguntas como ¿Cuál de ellos puede ser el más adecuado para cumplir con las necesidades de nuestro propósito?. de hecho, no hay una respuesta simple a ésta pregunta. Algunos aspectos a considerar son:

- Capacidad de carga del fármaco.
- Posibilidad de transporte hasta el sitio blanco.
- Capacidad del transportador (interacción con el medio biológico, grado de degradación, y acumulación en órganos)
- Toxicidad aguda y crónica.
- Escalamiento de la producción.
- Estabilidad física y química de almacenaje.
- Costo total

II.5.2 Nuevas estrategias para el transporte de fármacos a través de la BHE.

Desde la comprobación de que el cambio en la permeabilidad de la BHE modificando su arquitectura representaba un alto riesgo para la salud [43], se ha optado por estrategias menos riesgosas e igualmente eficaces en el transporte de moléculas (Fig. 9). Los pro-fármacos son un ejemplo de estas estrategias, la manipulación no compromete la integridad de la BHE, con este método, el compuesto original es modificado para hacerlo más liposoluble,

previéndole de esta manera mayor penetración al SNC. No todos los compuestos pueden ser manipulados ya que existe una alta probabilidad de modificarse su actividad terapéutica y por tanto farmacocinética, y necesitan ser registrados como nuevas entidades químicas. Ante este panorama, resulta evidente que la estrategia alternativa que logra solucionar los problemas anteriores es el uso de acarreadores o transportadores (misma denominación) que incorporan al fármaco, enmascarando sus propiedades ante el formidable grupo de defensa y muralla que representa la BHE, siendo similarmente al caballo de Troya de allí que a estos tipos de sistemas también se les denomina caballo troyano. [44, 45, 46, 47, 48, 49]

Otra alternativa para la liberación de fármacos al cerebro es utilizar acarreadores nativos expresados en la BHE. Los acarreadores nativos de la BHE transportan compuestos grandes e hidrofílicos a través de la barrera como colina, purinas, aminoácidos y lipoproteínas. Se sabe de fármacos que precisamente son transportados por este tipo de acarreadores, ejemplos de ellos son: baclofen, melfan, sulfoximina, azaserina y alfa-metil-DOPA. Sin embargo, el número de fármacos con este potencial es limitado debido a que los transportadores muestran alta especificidad por los sustratos. Las NP's pueden atravesar la BHE por difusión pasiva, endocitosis mediada por receptor, entre otros mecanismos, sin una especificidad molecular por un acarreador nativo. Actualmente, es posible diseñar NP's con ligados sobre la superficie de alta afinidad para estos transportadores, entonces las NP's fungen como vectores hacia el cerebro o a otros sitios de liberación dirigida. [50, 51]

Los transportadores antes mencionados funcionan en la dirección de la sangre al cerebro o influjo, pero además también existen transportadores de transporte activo primario (como glicoproteínas-P, proteínas de resistencia multifármacos, entre otros) también localizados en la BHE para detoxificación y/o prevención de compuestos no esenciales en el interior del cerebro. Mientras que el mecanismo natural es benéfico para el organismo, estos transportadores también muestran especificidad por su sustrato. Se ha propuesto inhibir la aparición de estos transportadores de transporte activo primario para que por estos canales pudiesen atravesar fármacos, sin embargo la inhibición puede comprometer al SNC o provocar una toxicidad periférica.

La inyección directa hacia el interior del cerebro es otra propuesta para evadir la BHE, incluso fue de las primeras estrategias propuestas y que de manera considerable predomina en la práctica clínica a nivel mundial. Como ejemplo se puede mencionar la infusión intracerebroventricular en el fluido cerebroespinal del factor de crecimiento de nervios en pacientes con Alzheimer, la implantación en el interior del parénquima cerebral de una matriz polimérica conteniendo el factor de crecimiento de nervios. En primera instancia esta técnica representa ventajas en pacientes graves, aunque también la primera desventaja es la neurocirugía extremadamente invasiva, además se cree que la difusión del fármaco del sitio inyectado puede ser una terapia limitante. La aplicación de un campo electromagnético de 2.45GHz por 45 minutos incrementó la permeabilidad de escopolamina hacia el cerebro por disrupción de la BHE. El campo electromagnético puede producir un efecto térmico que resulta en un aumento del flujo sanguíneo y en el intercambio en la permeabilidad de la BHE. También se ha demostrado que un incremento de la temperatura interna o aún ambiental logra aumentar la permeabilidad de la BHE.

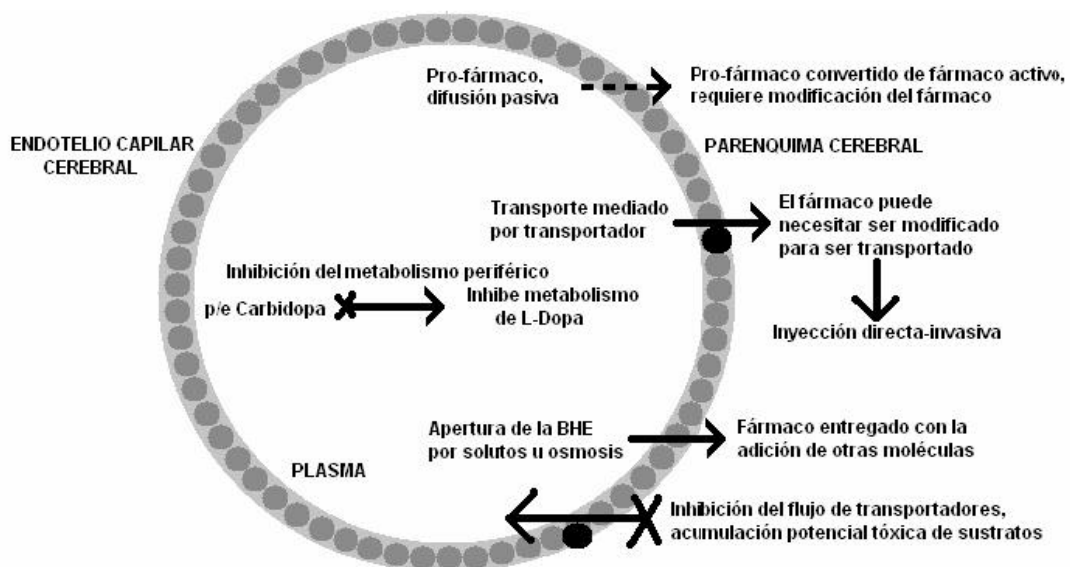


Fig.9 Mecanismos propuestos para incrementar el paso de fármacos a través de la barrera hematoencefálica, modificado de [52].

El uso de NP's como acarreadores coloidales de fármacos tiene una ventaja decisiva sobre las estrategias propuestas anteriormente para evadir el control de la BHE por las características de las NP's lipídicas. [53, 54, 55]

II.5.3 Fármacos formulados en nanopartículas dirigidos hacia el cerebro.

El término nanopartícula usado como nombre colectivo para describir tanto nanoesferas (NE's) como nanocápsulas. La diferencia entre estas dos formas es debido a su morfología y arquitectura de la partícula. Las nanoesferas están formadas por una densa matriz lipídica o polimétrica, mientras que las nanocápsulas están compuestas de un centro oleoso cubierto por una membrana polimétrica [56]. Para los propósitos de este estudio se utilizará el término NP para referirse a NE's exclusivamente.

Las NP's son partículas coloidales sólidas con un rango en tamaño de 1 a 1000nm y son utilizadas como agentes de entrega de fármacos. El uso de NP's para liberar fármacos hacia el cerebro a través de la BHE puede proveer una ventaja significativa a las estrategias actuales. La principal ventaja de la tecnología de transportadores nanoparticulados es que las NP's enmascaran a las moléculas del fármaco de las características limitantes de la BHE. Además este sistema puede disminuir la velocidad de liberación del fármaco en el cerebro, disminuyendo la toxicidad periférica.

La tecnología de NP's aparece para dar un significado promisorio en la entrega de moléculas terapéuticas a través de la BHE. En la tabla 1 se enlistan las propiedades ideales de los acarreadores utilizados para este propósito.

Las NP's consisten de varias macromoléculas en las cuales las moléculas terapéuticas pueden ser adsorbidas, atrapadas, o fijadas colectivamente. Una unidad de las NP's es para servir como un nuevo transportador para la entrega de fármacos por todos los tejidos del cuerpo. El disfrazamiento del fármaco puede permitir el paso a través de la membrana previamente impermeable. Una vez que las NP's han alcanzado los tejidos deseados, la

liberación del fármaco puede ocurrir por deserción, difusión a través de la matriz de la NP o erosión de la NP o alguna combinación de cualquiera de ellas o de todos los mecanismos. [52, 57, 58].

Tabla 1 Propiedades ideales de NP's poliméricas para la entrega de fármaco a través de la BHE [52].

-
- a) Polímero sintético o natural
 - b) No muy costoso
 - c) No tóxico
 - d) Biodegradable/biocompatible
 - e) No trombogénico
 - f) No inmunogénico

Diámetro de partícula < 100 nm

Estable en sangre (p/e, no opsonización por proteínas)

Dirigido a la BHE (p/e, uso de células ligadas a la superficie, endocitosis mediada por receptor)

No activación de neutrófilos

No agregación de plaquetas

Evitar el sistema reticuloendotelial

No inflamatorio

Tiempo en circulación prolongado

Con posibilidad de ser escalable y costo-efectivo en el proceso de manufactura

Receptivo de moléculas pequeñas, péptidos, proteínas o ácidos nucleicos

Estudios recientes sobre esta área de investigación han evaluado el efecto terapéutico de NP's con anestésicos principalmente, y fármacos con sitio de acción en el cerebro (tabla 2). En la mayoría de los casos el efecto terapéutico se ve incrementado cuando el fármaco es formulado en NP's. Gran parte de las NP's evaluadas son de composición polimérica. [52]

Tabla 2 Ejemplos de NP's usadas para la entrega de fármacos a través de la BHE [52]

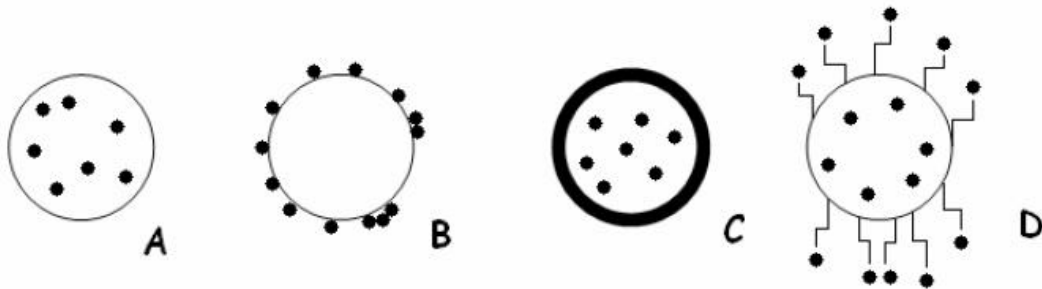
Fármaco evaluado	Tipo de NP	Polímero o estabilizante	Surfactante	Tamaño (nm)	Resultado
Camfotericina	SLN		Poloxámero 188	196.8	Incremento de ABC máx 10.4 a 27 en transporte a través de un modelo <i>in vitro</i> de BHE
Dalargin	SN	Polibutilcianoacrilato	Polisorbato 80	260	Estudio de analgesia, incrementó latencia 50%
Ácido valproico	SN	Butilcianoacrilato/dextran 70 Kda, polisorbato-8	Polisorbato 80	No evaluado	No incrementó concentración en cerebro
Dalargin, Citorfina	SN	Polibutilcianoacrilato/dextran 70 Kda, polisorbato-8	Polisorbato 80	Dextran: 288 Poli: 80-195	Estudio de analgesia, incrementó latencia ~50%
Amitriptilina	SN	Polibutilcianoacrilato/dextran 70 Kda, polisorbato-8	No recubrimiento	Dextran: 288 Poli: 80-195	Incrementó ABC en cerebro > 50%
Doxorubicin	SLN	Ácido esteárico	Epikuron 200	90	Niveles ~ ¼ del plasmático a las 4 hr vs cero en cerebro sin NP
Dalargin	SN	Polibutilcianoacrilato/dextran 70 Kda	Polisorbato 80	230	Estudio de analgesia, incrementó efecto de analgesia ~50%
Tubocurarina	SN	Butilcianoacrilato/dextran 70 Kda	Polisorbato 80	230	Picos epileptiformes sobre EEG ~ 6mg/kg (brain) en 2-5 hr, vs cero sin transportador
Doxorubicina	SN	Butilcianoacrilato/dextran 70 Kda	Polisorbato 80	270	
Nps radiomarcadas	SN	Poli-metilmetacrilato	Poloxámero 338	No evaluado	No incrementó
			Poloxamina 908		No incrementó
			Poloxámero 188		~ 10% Incrementó
			Poloxámero 407		~ 17.5% Incrementó
			Polisorbato 80		~ 15.1% Incrementó

SN: nanoesfera sólida (solid nanoparticle)

SLN: nanoesfera lipídica sólida (solid lipid nanoparticle)

Son posibles varias estructuras de NP's que dependen principalmente del proceso de manufactura empleado. El fármaco es absorbido sobre la superficie de la NP cuando se coloca una dispersión de NP's en una solución saturada del fármaco disuelto, por diferencias de áreas específicas y en términos de estabilidad, el fármaco se adsorberá sobre la superficie de la NP, este es un

mecanismo saturable. Es muy probable que cuando se obtienen NP's con fármaco entrampado ó disperso homogéneamente en el mismo proceso de manufactura se logre absorber parte de fármaco, por lo que la NP resultante tendrá fármaco adsorbido y además entrampado, esta adsorción posiblemente será menor que cuando se elabora en un proceso meramente adsortivo y hay mayor cantidad de fármaco dispuesto en el medio [52].



- A. NP coloidal sólida con fármaco disperso homogéneo (nanoesfera con fármaco absorbido).
- B. NP sólida con fármaco adsorbido
- C. Nanocápsula con fármaco entrampado.
- D. NP coloidal sólida con fármaco disperso homogéneamente y células ligadas en la superficie

Fig.10 Tipos de nanopartículas cargadas con fármaco para liberación en el SNC [52]

II.5.4 Liberación de fármacos a partir de NP's.

El análisis farmacocinética de la liberación de doxorubicina a partir de NP's de tipo polimérico fue caracterizado como una ecuación bi-exponencial [52].

Este modelo sugiere que hay un removimiento rápido inicial de fármaco de la nanopartícula posiblemente relacionado a una pronta pérdida de fármaco fijada ligeramente sobre la superficie de la NP (fármaco adsorbido). Una vez que la liberación rápida del componente, hay una más lenta, una liberación mucho más controlada del fármaco debido a la degradación de la matriz que constituye la NP y difusión del fármaco a través de ésta (Fig. 12) [59]

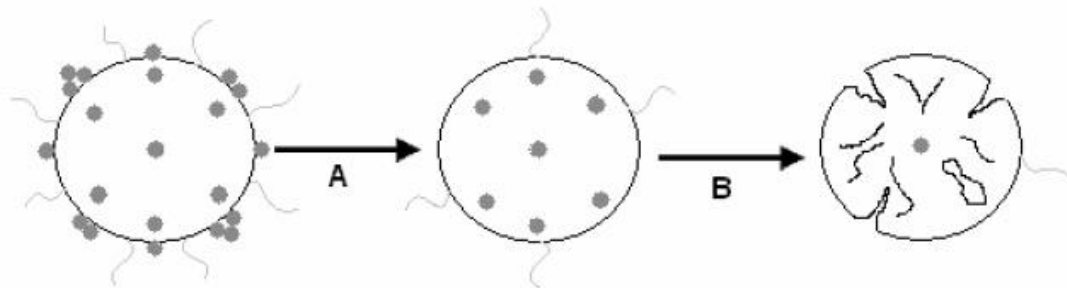


Fig. 11. Análisis farmacocinética de la liberación de fármaco a partir de NP's [52]

- A. Desorción rápida inicial del fármaco sobre la superficie de la NP, efecto conocido como explosión.
- B. Liberación lenta controlada del fármaco. Caracterizada por fenómenos de orden cero y uno. La liberación es dependiente de la degradación o erosión de la NP.

La cinética de orden cero tiende a ocurrir en NP's biodegradables, la liberación de primer orden ocurre con NP's no biodegradables. A pesar de la cinética de liberación del fármaco, la liberación parece ser dependiente de la degradación o erosión y tipo de almacén o estructura de la NP.

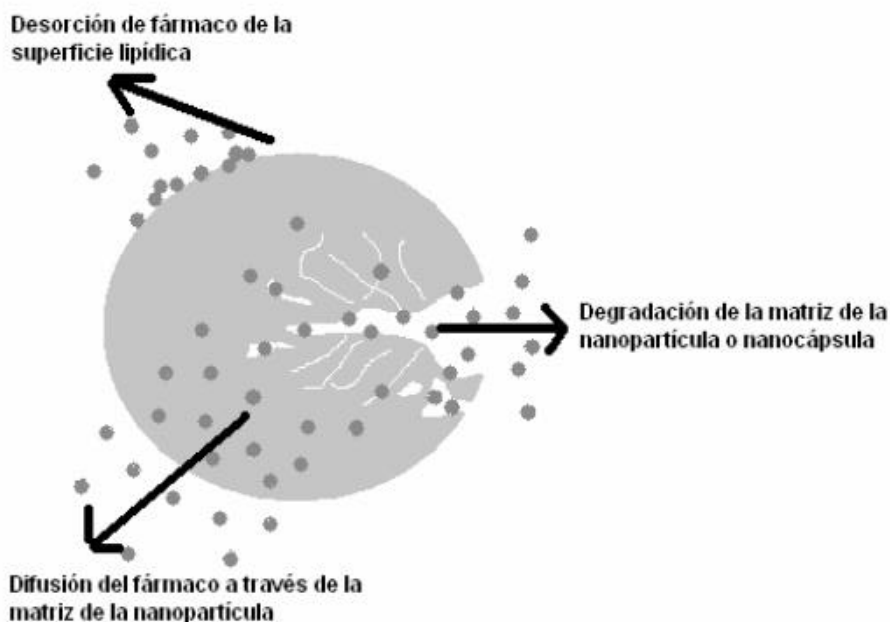


Fig. 12. Mecanismos de liberación de fármacos a partir de NP's, puede ser uno o una combinación de cualquiera o de todos los mecanismos propuestos [52]

Existen diversas posibilidades que pueden explicar el mecanismo de liberación de fármacos a través de la barrera hematoencefálica.

- A. Un incremento en la retención de las nanopartículas en los capilares sanguíneos del cerebro combinado con una absorción en las paredes del capilar. Esto podría crear un gradiente de concentración que podría incrementar el transporte a través de la capa de células endoteliales y se daría como resultado la liberación hacia el cerebro.
- B. Un efecto surfactante general caracterizado por una solubilización de los lípidos que constituyen la membrana de las células endoteliales y que podría provocar la fluidización de la membrana y por lo tanto un incremento en la permeabilidad de fármacos a través de la barrera hematoencefálica.
- C. Las nanopartículas podrían provocar una apertura de las uniones estrechas de las células endoteliales. El fármaco podría entonces permear a través de estas uniones estrechas en forma libre o también de forma enlazada a las nanopartículas.
- D. Las nanopartículas pueden ser endocitadas por las células endoteliales seguida por la liberación del fármaco en el interior de estas células y posteriormente al cerebro.
- E. Las nanopartículas con el fármaco de alguna manera enlazado puede ser transciósadas (paso transcelular) a través de la capa de células endoteliales.
- F. Sustancias como el polisorbato 80 usadas como agentes de recubrimiento pueden inhibir el sistema de transporte de sustancias comunes, especialmente a glicoproteína-P [58].

De los mecanismos mencionados anteriormente el A y B son poco probables que contribuyan según lo observado en la liberación de fármacos a partir de NP's en el cerebro, para el caso de loperamida, doxorubicina y tubocurarina.

También se cree muy improbable que la creación de regiones locales de alta concentración en los capilares cerebrales pudiese ser suficiente para superar los efectos de las bombas de transporte activo primario localizadas en la membrana luminal de las células endoteliales como lo es la glicoproteína-P (mecanismo A). También es poco común un efecto surfactante general (mecanismo B), de acuerdo con los experimentos de Kreuter et al 1997, que evaluó distintos surfactantes, únicamente las NP's de dalargin recubiertas con polisorbato provocaron un efecto terapéutico, los otros surfactantes que son buenos agentes solubilizantes no lograron transportar dalargin hacia el cerebro en concentraciones farmacológicamente suficientes [58]. En cuanto a la apertura de las uniones estrechas de la BHE, experimentalmente existen regiones próximas, cuya medición de la actividad sirve como medición indirecta de la integridad de las uniones estrechas, esta región es llamada espacio de inulina. Se ha demostrado que en estudios con ratas tratadas con NP's cubiertas con polisorbato 80, los espacios de inulina se incrementaron hasta un 99% al cabo de 45min. Este incremento sugirió que las NP's cubiertas incrementaron el volumen disponible para los espacios de inulina intravascular y no se registró una alteración significativa de la BHE este incremento se pudo deber a una ligera apertura de las uniones estrechas, un plegamiento (doblamiento) de las membranas celulares debido a eventos endocitóticos, o a un incremento de la endocitosis por fluido de fase de inulina asociado con la internalización de las nanopartículas. En estos experimentos se ha llegado a observar un efecto muy pronto el cual es asociado a que cierta cantidad de NP's logran atravesar sin ningún impedimento las uniones estrechas de la BHE [58, 60, 61].

El mecanismo más probable de transporte de fármacos mediado por NP's hacia el cerebro es el mecanismo D, la endocitosis de las NP's y liberación del fármaco en el interior de estas células. Además, se ha observado de manera característica en estas mismas NP's la adsorción de apolipoproteína E cuando no tenía el surfactante y cuando se utilizó poloxámeros. Es probable que la apolipoproteína E interfiera en el transporte de fármacos hacia el cerebro a partir de NP's. La apolipoproteína E transporta de manera natural hacia el cerebro lipoproteínas de baja densidad. Es probable que las NP's cubiertas con polisorbato mimeticen a partículas de lípidos de baja densidad, y de esta

manera la apolipoproteína E los transporte también hacia el cerebro sin distinción alguna. El mecanismo completo es descrito como un acto de caballo troyano [58].

Según la tabla 2 podemos observar que también se han evaluado NP's poliméricas de otra composición matricial y estabilizada con poloxameros además de NP's lipídicas, en ambos casos se ha observado un incremento en el efecto terapéutico en otros fármacos debido a las NP's. esto resulta en pensar que aunque el agente estabilizante que está en contacto directo con el medio sanguíneo determina diversas reacciones de los componentes plasmáticos que probablemente incrementarían el paso del fármaco por un comportamiento de caballo troyano, también la composición matricial es determinante en el tipo de interacción con los componentes plasmáticos y con la maquinaria estructural y metabólica de la BHE.

II.5.5 Nanopartículas lipídicas: antecedentes y campo de aplicación.

Las ventajas de las nanoemulsiones incluyen seguridad toxicológica y un alto contenido de la fase lipídica, también como la posibilidad de producción a gran escala usando homogenización de alta presión. Sin embargo, la liberación controlada de nanoemulsiones presenta problemas debido a su tamaño pequeño y el estado líquido del transportador, la liberación controlada a partir de nanoemulsiones requiere fármacos muy lipofílicos (coeficiente de partición octanol/agua mayor a 1,000,000:1) [3].

Por consiguiente el empleo de lípidos sólidos en lugar de aceites líquidos resulta ser una opción viable para lograr la liberación controlada de fármacos debido a que la movilidad de fármaco en un lípido sólido debería de ser considerablemente menor comparada con un aceite líquido. Además, la estabilidad de ciertos fármacos puede ser mayor en una matriz sólida comparada con un lípido líquido [62, 59, 63, 4, 64, 65].

El grupo de investigación a cargo de Speiser, fue el pionero en desarrollar transportadores lipídicos sólidos bajo las condiciones de manufactura de éstos

transportadores; era imposible obtener sistemas con un tamaño de partícula homogéneo, por lo que el área de aplicación de éstos nuevos sistemas era reducido y con riesgo. Pronto se encontró que el homogenizador de alta presión (utilizado anteriormente para la producción de sistemas dispersos micro y nanoparticulados) era más efectivo para la producción de dispersiones submicrónicas de lípidos sólidos que el mezclador de alto corte o ultrasonido; las dispersiones obtenidas de ésta manera son llamadas nanopartículas lipídicas sólidas (nanoesferas lipídicas) y la mayoría se caracterizan por un tamaño de 100 a 200nm y un bajo contenido de micropartículas [3].

II.5.6 Importancia de las nanopartículas lipídicas.

Las nanoesferas lipídicas disminuyen las desventajas de otros transportadores coloidales. El propósito de las ventajas incluye:

- Posibilidad de liberación controlada y entrega en el sitio específico de fármacos.
- Incremento de la estabilidad del fármaco.
- Alta carga útil.
- Factibilidad de incorporación de fármacos liposolubles e hidrofílicos.
- Ausencia de biotoxicidad del transportador.
- No utilizar solventes orgánicos.
- Facilitar la producción a gran escala y el proceso de estabilización [66, 67].

II.5.7 Ingredientes utilizados para elaborar nanopartículas lipídicas.

De manera general las NP's lipídicas se pueden preparar con un fármaco, un lípido sólido, emulsificante y agua. Dependiendo de la aplicación, otros ingredientes pueden estar presentes (agentes osmóticos, matrices para liofilización, buffers, entre otros) [4].

El peligro de toxicidad que puede resultar de los lípidos que integran a las NP's es bajo porque en general, se utilizan lípidos fisiológicos que son bien tolerados por el cuerpo, esta característica provee una de las principales ventajas a las nanoesferas lipídicas sobre otras TSF [59, 68].

Los lípidos utilizados como ingredientes para las nanoesferas lipídicas pueden ser triglicéridos (P. ej. tristearina), glicéridos parciales (P. ej. monoestereato), ácidos grasos (P. ej. ácido esteárico), esteroides (P. ej. colesterol) y ceras (P. ej. cetilpalmitato). El tipo de agente emulsificante depende principalmente de la ruta de administración y es más limitado para la vía parenteral, los tipos más utilizados son poloxámeros, polisorbatos, lectina y ácidos biliares. En muchos casos, la combinación de emulsificantes resulta más eficiente para prevenir la aglomeración de partículas. [69, 70, 71].

III. OBJETIVOS

Evaluar el efecto ansiolítico de las nanopartículas con clonazepam mediante la administración de éstas a ratones albino adultos para conocer las ventajas de esta nueva formulación.

- **Objetivos Particulares**

- Aplicar al modelo de Plus Maze como referencia para conocer el efecto ansiolítico del diazepam en ratón macho albino.
- Cuantificar el efecto ansiolítico del clonazepam encapsulado en nanoesferas lipídicas como un nuevo vector de fármacos para incrementar su transporte y así su efecto farmacológico mediante el uso del modelo Elevated Plus Maze.

IV. HIPOTESIS

Si las nanoesferas lipidicas, que contienen el clonazepam pueden facilitar el paso del fármaco a través de la Barrera Hematoencefálica, entonces observaremos un incremento significativo del efecto ansiolítico del clonazepam contenido en las NP's en comparación con la dispersión de clonazepam a pH de 7 y con el lote administrado con nanopartículas placebo.

V. MATERIALES Y METODOS

Materiales y reactivos

Material de laboratorio y equipos.

- 2 Modelos Plus-Maze (laberinto de cruz elevado)
- Prueba de Tracción (Traction Test)
- 3 Cronómetros
- Bitácora
- Papel celofán de color rojo.
- Agitador
- Barras magnéticas

Reactivos

- Agua
- Solución Lipídica (Lípido macerado disperso en agua)
- Dispersión de Clonazepam a pH 7 a Dosis de 0.1mg/Kg.
- Solución de Diazepam (Solución Testigo a Dosis de 0.1 mg/Kg.)
- Solución de Nanoparticulas cargadas con los principios activos
 - Dosis 0.1mg/Kg.
 - Dosis media 0.05mg/Kg.
- Solución de Nanoparticulas placebo

Material Biológico

- 96 Ratones blancos (*Mus musculus albinus*) macho CD1 de 30g +/- 5g del bioterio de CINVESTAV-IPN (unidad Sur); México.

V.1 Metodología y Diagrama de flujo

Metodología

La experimentación se llevó a cabo en el laboratorio de Farmacología del Miocardio en la FES Cuautitlán Campo 1, siendo ésta un área cerrada con ventilación y una temperatura ambiente adecuados y en el horario de 12:00 a 15:00 p.m. Las fuentes de luz fueron cubiertas con papel celofán de color rojo, con la finalidad de crear un ambiente de oscuridad para evitar estrés en los ratones y así reducir errores por falsos positivos.

Antes de iniciar la evaluación de las nanopartículas lipídicas se llevó a cabo una estandarización previa con una solución testigo de Diazepam a una dosis de 0.1mg/Kg. con la finalidad de analizar los resultados y las variantes que pudieran ocurrir ante el experimento. Esta fase resultó sin contratiempos y sirvió para capacitarnos para la fase siguiente.

Los ratones fueron pesados y distribuidos en 7 lotes de 12 ratones cada uno con la finalidad de homogeneizar valores y que estos no carecieran de carácter estadísticamente significativo.

Una vez distribuidos dejamos pasar una hora antes de iniciar con el experimento esto con la finalidad de proporcionar una ambientación adaptada a las condiciones de oscuridad y de temperatura del lugar.

Los animales de los lotes fueron administrados y se les dió un lapso de 10 minutos antes de pasar a la Prueba de Tracción para ratones la cual consiste en lo siguiente: los ratones son forzados a colgarse con los miembros delanteros en un alambre de (1.6mm de diámetro) en una posición horizontal el cual tiene 30cm de altura. El ratón tiene que ser capaz de agarrar el alambre con los miembros traseros en un lapso de 10 segundos, si el animal no es capaz de agarrar el alambre con sus miembros traseros en este lapso de tiempo la prueba se considera como positiva. Esta prueba se realiza por triplicado antes y después del modelo de Plus-Maze para verificar el estado de relajación muscular.

En todos los casos, la prueba dió negativo y con ellos avanzamos al Modelo Plus-Maze. La actividad ansiolítica es medida usando la prueba del laberinto en cruz elevado (Plus-Maze). El laberinto consiste en dos brazos abiertos dos cerrados cada uno de 5cm de ancho y 30cm de largo, éste tiene una altura de 45 centímetros sobre el piso. Los ratones fueron colocados individualmente en el centro del laberinto frente a un brazo abierto, y el número de entradas y del tiempo de permanencia en cada brazo cerrados y abiertos es registrado durante un período de observación de 5min. Las entradas en cada brazo son definidas cuando el ratón mete las cuatro patas en un brazo. El porcentaje de entradas en brazos abiertos y cerrados es conocido calculando la fracción de cada uno de las entradas totales.

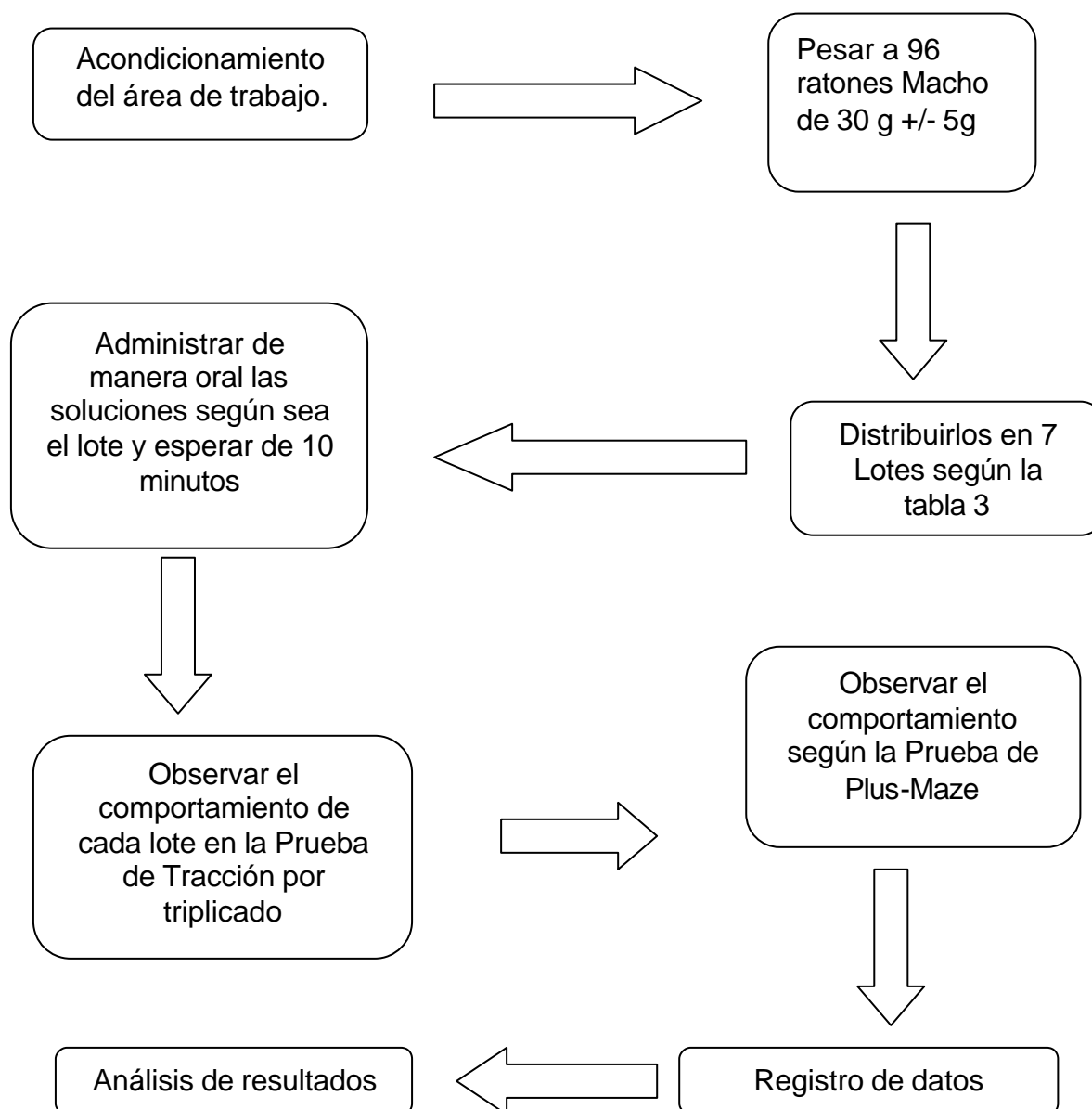


Fig. 13 Diagrama De Flujo.

Tabla 3 Lotes de trabajo

Lote	Detalle
a	Solución Diazepam a una Dosis de 0.1mg/Kg.
1	Agua
2	Solución Lipídica (Lípido macerado disperso en agua)
3	Clonazepam a pH 7 a una Dosis de 0.1mg/Kg. Problema No 2
4	Solución de Nanoparticulas cargadas con Clonazepam Dosis 0.1mg/Kg.
5	Solución de Nanoparticulas cargadas con Clonazepam Dosis 0.05mg/Kg.
6	Nanoparticulas Placebo

El formato que usamos como registro de tiempo, número de entradas, Notas y Datos extra fue el siguiente:

Trabajo de tesis: evaluación del efecto ansiolítico de nanopartículas con clemastina en ratones a través del modelo plus maze y modelo de tracción

LOTE:			FECHA:
Ratón	Peso(g)	Administrar: (ml)	Hora de Administración
1			
2			
3			
4			
5			
6			
Observaciones:			

PBA	I	REGISTRATIVO
1		
2		
3		
4		
5		
6		

Elevated Plus Maze Test.

Ratón	#EBA					#EBC					tEBA	tEBC	tC
1	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5			
	6	7	8	9	10	6	7	8	9	10			
	11	12	13	14	15	11	12	13	14	15			
	16	17	18	19	20	16	17	18	19	20			
	Total:					Total:							
2	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5			
	6	7	8	9	10	6	7	8	9	10			
	11	12	13	14	15	11	12	13	14	15			
	16	17	18	19	20	16	17	18	19	20			
	Total:					Total:							
3	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5			
	6	7	8	9	10	6	7	8	9	10			
	11	12	13	14	15	11	12	13	14	15			
	16	17	18	19	20	16	17	18	19	20			
	Total:					Total:							
4	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5			
	6	7	8	9	10	6	7	8	9	10			
	11	12	13	14	15	11	12	13	14	15			
	16	17	18	19	20	16	17	18	19	20			
	Total:					Total:							
5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5			
	6	7	8	9	10	6	7	8	9	10			
	11	12	13	14	15	11	12	13	14	15			
	16	17	18	19	20	16	17	18	19	20			
	Total:					Total:							
6	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5			
	6	7	8	9	10	6	7	8	9	10			
	11	12	13	14	15	11	12	13	14	15			
	16	17	18	19	20	16	17	18	19	20			
	Total:					Total:							
Totales													

Fig. 14 Cuadro control de trabajo.

Este formato fue realizado con la finalidad de tener una recopilación más organizada de los datos. Cada hoja representa 6 valores correspondientes a

cada ratón en particular. La primera tabla muestra los datos de cada ratón, fecha, hora de administración, peso, posología y observaciones pertinentes.

La tabla pequeña en la parte superior derecha es la de prueba de tracción la cual nos indica si la prueba fue positiva o negativa,

La tabla de *Laberinto de Cruz Elevado* indica el número de entradas a brazo abierto (#EBA) y el número de entradas a brazo cerrado (#EBC). Por cada entrada a cualquier brazo tachamos el número en cuestión, y esto tuvo como finalidad el evitar errores dado la dificultad del modelo. Al final anotamos el número final en el apartado de "Total". Los recuadros que dicen tEBA, tEBC y tC corresponden al tiempo que permaneció el ratón en los brazos o en el centro. Cabe mencionar que el tiempo fue tomado con cronómetros y en el apartado de tiempo solo anotamos el tiempo final.

V.2 Evaluación

Los ratones fueron distribuidos de acuerdo al siguiente orden:

V.2.1 Lote: Blanco

Este lote de 12 ratones fue administrado con agua vía oral y sirvió como lote de referencia, en el observamos el comportamiento natural de los ratones y analizamos su naturaleza sólo ante el estrés producido por la administración.

V.2.2 Lote: Solución Lipídica

El Compritol® ATO 888 es el vehículo en el cual se encontraban dispersas las nanopartículas que usamos.

Esta constituido por una mezcla de mono, di y triglicéridos del ácido behénico. Su composición de átomos de carbono es la siguiente: C16 (<3.0%), C18 (<5.0%), C20 (<10%), C22 (>83%) y C24 (<3.0%). Tiene una fracción de 12-18% de monoglicéridos, 52-54% de diglicéridos y 28-32% de triglicéridos. Es obtenido a partir de materia prima de origen vegetal.

Se usa como lubricante en la preparación de cápsulas y tabletas, agente aglutinante para la compresión directa, matriz lipofílica para la preparación de sistemas de liberación sostenida de fármacos, tanto en tabletas como en cápsulas.

Toxicidad aguda del lípido puro por vía oral: DL50 > 2000 mg/kg, Irritación ocular del lípido puro: Media, Irritación cutánea: Ligera, Irritación ocular (5% en aceite de nuez): Bien tolerada

Es soluble en cloroformo, cloruro de metileno caliente. Insoluble en agua, etanol (96°), n-hexano y aceite mineral.

Tabla Nº 4 Composición y algunas propiedades fisicoquímicas del Compritol® ATO 888

Especificación	Descripción
Rango de fusión	69-74 °C
Valor de acidez	< 4.00 mg KOH/g
Valor de saponificación	145 a 165 mg/kg
Contenido de agua	< 1 %
Contenido de glicerol libre	< 1 %
Monoglicéridos totales	13.0-21.0 %
Diésteres totales	40.0-60.0 %
Triésteres totales	21.0-35.0 %
Ácido behénico (C22)	> 83.0 %
Ácido araquídónico (C20)	< 10.0 %
Ácido esteárico (C18)	< 5.0 %
Ácido palmítico (C16)	< 3.0 %
Ácido lignocérico (C24:0)	< 3.0 %
Ácido erúcico (C22:1)	< 3.0 %

V.2.3 Dispersión de Clonazepam a pH 7 a Dosis de 0.1mg/Kg.

El grupo de 12 animales pertenecientes a éste lote fue administrado con una dispersión de clonazepam en agua, el clonazepam no es soluble en tal solución por lo que se agitó 5 minutos antes de cada administración oral.

V.2.4 Solución De Diazepam (Solución Testigo a Dosis de 0.1mg/Kg.)

Entre los usos del Diazepam, a dosis bajas, produce efectos ansiolíticos, este lote de 12 ratones fueron administrados con ésta solución con la finalidad de estudiar su comportamiento, analizar los detalles, tiempos, observaciones y sincronía entre ambos integrantes de este trabajo ante un efecto ansiolítico positivo.

V.2.5 Solución de Nanopartículas cargadas con los Principios activos a Dosis 0.1mg/Kg y a Dosis media 0.05mg/Kg.

Éstos 2 lotes fueron administrados con la dispersión de nanopartículas con Clonazepam a las dosis de 0.1 mg/Kg. y 0.05mg/Kg. respectivamente.

V.2.6 Solución de Nanopartículas placebo

Este lote fue administrado sólo con placebo de nanopartículas lipídicas

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

MODELO PLUS - MAZE

Lote blanco (sin fármaco).

Tabla 5: Número de entradas y tiempo de permanencia en el modelo de Plus-Maze, lote blanco

RATÓN	#EBC	#EBA	TBA (SEG.)	TBC (SEG.)
1	2	0	0	269
2	9	1	10	241
3	13	7	112	178
4	2	0	0	220
5	7	0	0	210
6	7	0	0	198
7	10	3	55	233
8	6	0	0	225
9	4	3	50	200
10	12	0	0	226
11	7	1	78	173
12	9	2	50	238

Tabla 6: Porcentaje de entradas en brazos abiertos y porcentaje de tiempo de permanencia, lote blanco

RATÓN	%EBA	%TBA
1	0.0	0.0
2	10.0	4.0
3	35.0	38.6
4	0.0	0.0
5	0.0	0.0
6	0.0	0.0
7	23.1	19.1
8	0.0	0.0
9	42.9	20.0
10	0.0	0.0
11	12.5	31.1
12	18.2	17.4
?	141.6	130.1
μ	11.8	10.8
Desvest	15.1	13.9
E.E	4.36	4.012

Lote testigo (administrado con diazepam)

Tabla 7: Número de entradas y tiempo de permanencia en el modelo de Plus-Maze, lote testigo.

RATÓN	#EBC	#EBA	TBA (SEG.)	TBC (SEG.)
1	9	6	62	165
2	12	6	81	179
3	7	4	41	231
4	10	2	1	181
5	8	12	154	95
6	9	3	10	215
7	0	1	267	0
8	10	3	61	168
9	3	1	60	235
10	3	0	0	267
11	6	2	25	228
12	5	2	1	243

Tabla 8: Porcentaje de entradas en brazos abiertos y porcentaje de tiempo de permanencia, lote testigo.

RATÓN	%EBA	%TBA
1	40.0	27.3
2	33.3	31.2
3	36.4	15.1
4	16.7	0.5
5	60.0	61.8
6	25.0	4.4
7	100.0	100.0
8	23.1	26.6
9	25.0	20.3
10	0.0	0.0
11	25.0	9.9
12	28.6	0.4
?	413.0	297.6
μ	34.4	24.8
Desvest	25.1	29.6
E.E	7.25	8.54

Lote problema N° 1 (NP's con clonazepam a dosis terapéutica).

Tabla 9: Número de entradas y tiempo de permanencia en el modelo de Plus-Maze, lote problema N° 1.

RATÓN	#EBC	#EBA	TBA (SEG.)	TBC (SEG.)
1	8	8	136	140
2	17	11	100	140
3	14	24	205	84
4	7	3	32	234
5	13	7	69	200
6	0	1	289	1
7	8	8	136	140
8	17	11	100	140
9	14	24	205	84
10	7	3	32	234
11	13	7	69	200
12	0	1	289	1

Tabla 10: Porcentaje de entradas en brazos abiertos y porcentaje de tiempo de permanencia, lote problema N° 1.

RATÓN	%EBA	%TBA
1	50.0	49.3
2	39.3	41.7
3	63.2	70.9
4	30.0	12.0
5	35.0	25.7
6	100.0	99.7
7	50.0	49.3
8	39.3	41.7
9	63.2	70.9
10	30.0	12.0
11	35.0	25.7
12	100.0	99.7
?	634.9	598.4
μ	52.9	49.9
Desvest	24.7	30.2
E.E	7.99	8.71

Lote problema N° 2 (NP's con clonazepam a dosis media).

Tabla 11: Número de entradas y tiempo de permanencia en el modelo de Plus-Maze, lote problema N° 2.

RATÓN	#EBC	#EBA	BA (SEG.)	TBC (SEG.)
1	5	1	5	171
2	5	2	13	240
3	4	4	41	170
4	2	1	27	250
5	15	10	96	150
6	2	8	142	140
7	5	1	5	171
8	5	2	13	240
9	4	4	41	170
10	2	1	27	250
11	15	10	96	150
12	2	8	142	140

Tabla 12: Porcentaje de entradas en brazos abiertos y porcentaje de tiempo de permanencia, lote problema N° 2.

RATÓN	%EBA	%TBA
1	16.7	2.8
2	28.6	5.1
3	50.0	19.4
4	33.3	9.7
5	40.0	39.0
6	80.0	50.4
7	16.7	2.8
8	28.6	5.1
9	50.0	19.4
10	33.3	9.7
11	40.0	39.0
12	80.0	50.4
?	497.1	253.1
μ	41.4	21.1
Desvest	20.9	18.6
E.E	6.03	5.36

Lote problema N° 3 (NP's sin p.a.)

Tabla 13: Número de entradas y tiempo de permanencia en el modelo de Plus-Maze, lote problema N° 3.

RATÓN	#EBC	#EBA	TBA (SEG.)	TBC (SEG.)
1	8	3	30	202
2	9	0	0	279
3	7	5	74	160
4	5	1	28	223
5	7	8	98	130
6	4	4	120	178
7	8	3	30	202
8	9	0	0	279
9	7	5	74	160
10	5	1	28	223
11	7	8	98	130
12	4	4	120	178

Tabla 14: Porcentaje de entradas en brazos abiertos y porcentaje de tiempo de permanencia, lote problema N° 3.

RATÓN	%EBA	%TBA
1	27.3	12.9
2	0.0	0.0
3	41.7	31.6
4	16.7	11.2
5	53.3	43.0
6	50.0	40.3
7	27.3	12.9
8	0.0	0.0
9	41.7	31.6
10	16.7	11.2
11	53.3	43.0
12	50.0	40.3
?	377.9	277.9
μ	31.5	23.2
Desvest	19.8	16.7
E.E	5.71	4.82

Lote problema N° 4 (Lípido macerado disperso en agua).

Tabla 15: Número de entradas y tiempo de permanencia en el modelo de Plus-Maze, lote problema N° 4.

RATÓN	#EBC	#EBA	TBA (SEG.)	TBC (SEG.)
1	6	2	35	225
2	2	0	0	279
3	4	0	0	298
4	2	0	0	286
5	4	0	0	243
6	4	0	0	230
7	6	2	35	225
8	2	0	0	279
9	4	0	0	298
10	2	0	0	286
11	4	0	0	243
12	4	0	0	230

Tabla 16: Porcentaje de entradas en brazos abiertos y porcentaje de tiempo de permanencia, lote problema N° 5.

RATÓN	%EBA	%TBA
1	25.0	13.5
2	0.0	0.0
3	0.0	0.0
4	0.0	0.0
5	0.0	0.0
6	0.0	0.0
7	25.0	13.5
8	0.0	0.0
9	0.0	0.0
10	0.0	0.0
11	0.0	0.0
12	0.0	0.0
?	50.0	26.9
μ	4.2	2.2
Desvest	9.7	5.2
E.E	2.8	1.5

Lote problema N° 5 Dispersión de clonazepam a pH 7

Tabla 17: Número de entradas y tiempo de permanencia en el modelo de Plus-Maze, lote problema N° 5.

RATÓN	#EBC	#EBA	TBA (SEG.)	TBC (SEG.)
1	13	0	0	270
2	9	2	12	226
3	6	1	56	214
4	12	1	4	260
5	13	0	0	283
6	3	0	0	283
7	13	0	0	270
8	9	2	12	226
9	6	1	56	214
10	12	1	4	260
11	13	0	0	283
12	3	0	0	283

Tabla 18: Porcentaje de entradas en brazos abiertos y porcentaje de tiempo de permanencia, lote problema N° 5.

RATÓN	%EBA	%TBA
1	0.0	0.0
2	18.2	5.0
3	14.3	20.7
4	7.7	1.5
5	0.0	0.0
6	0.0	0.0
7	0.0	0.0
8	18.2	5.0
9	14.3	20.7
10	7.7	1.5
11	0.0	0.0
12	0.0	0.0
?	80.3	54.6
μ	6.7	4.5
Desvest	7.7	7.8
E.E	2.22	2.25

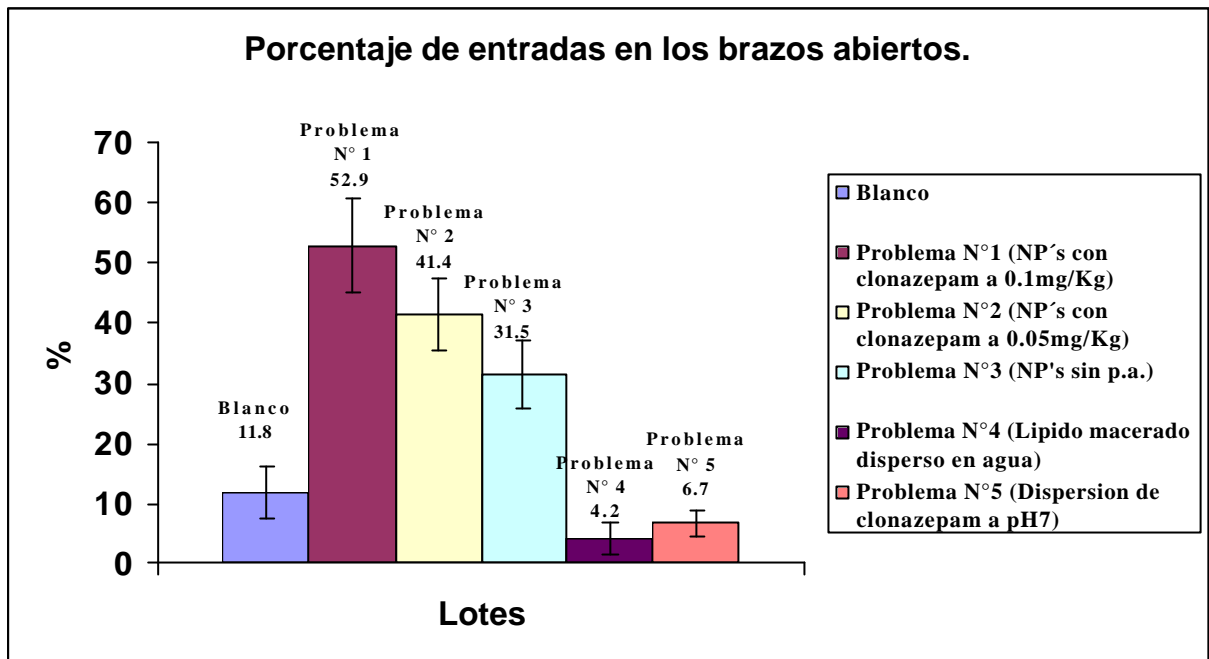


FIG. 14 Porcentaje de entradas en los brazos abiertos de el lote blanco, NP's a (0.1mg/Kg.), NP's a (0.05mg/Kg.), NP's sin p.a., lípido disperso en agua macerado y clonazepam disperso en agua a pH 7.

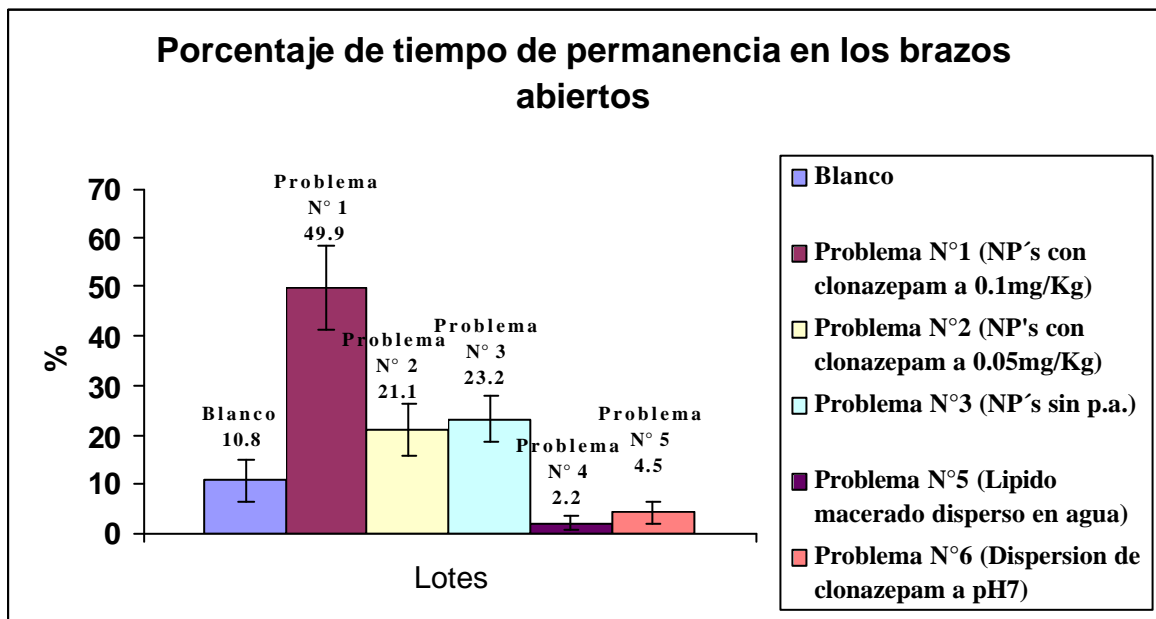


FIG. 15 Porcentaje de tiempo de permanencia en los brazos abiertos de el lote blanco, NP's a (0.1mg/Kg.), NP's a (0.05mg/Kg.), NP's sin p.a., lípido disperso en agua macerado y clonazepam disperso en agua a pH 7.

PRUEBA DE TRACCIÓN.

El ratón tiene que ser capaz de agarrar el alambre con los miembros traseros en un lapso de 10 segundos, si el animal no es capaz de agarrar el alambre con sus miembros traseros en este lapso de tiempo la prueba se considera como positiva.

Lote blanco (sin fármaco).

Tabla 19: Resultados de la Prueba de Tracción, lote blanco.

Ratón	+/-
1	Negativo
2	Negativo
3	Negativo
4	Negativo
5	Negativo
6	Negativo
7	Negativo
8	Negativo
9	Negativo
10	Negativo
11	Negativo
12	Negativo

Lote testigo (administrado con diazepam).

Tabla 20: Resultados de la Prueba de Tracción, lote testigo.

Ratón	+/-
1	Negativo
2	Negativo
3	Negativo
4	Negativo
5	Negativo
6	Negativo
7	Negativo
8	Negativo
9	Negativo
10	Negativo
11	Negativo
12	Negativo

Lote problema N° 1 (NP's con clonazepam a dosis terapéutica).

Tabla 21: Resultados de la Prueba de Tracción, lote problema N° 1.

Ratón	+/-
1	Negativo
2	Negativo
3	Negativo
4	Negativo
5	Negativo
6	Negativo
7	Negativo
8	Negativo
9	Negativo
10	Negativo
11	Negativo
12	Negativo

Lote problema N° 2 (NP's con clonazepam a dosis media).

Tabla 22: Resultados de la Prueba de Tracción, lote problema N° 2.

Ratón	+/-
1	Negativo
2	Negativo
3	Negativo
4	Negativo
5	Negativo
6	Negativo
7	Negativo
8	Negativo
9	Negativo
10	Negativo
11	Negativo
12	Negativo

Lote problema N° 3 (NP's sin clonazepam para dosis terapéutica).

Tabla 23: Resultados de la Prueba de Tracción, lote problema N° 3.

Ratón	+/-
1	Negativo
2	Negativo
3	Negativo
4	Negativo
5	Negativo
6	Negativo
7	Negativo
8	Negativo
9	Negativo
10	Negativo
11	Negativo
12	Negativo

Lote problema N° 4 (Lípido macerado disperso en agua).

Tabla 24: Resultados de la Prueba de Tracción, lote problema N° 4.

Ratón	+/-
1	Negativo
2	Negativo
3	Negativo
4	Negativo
5	Negativo
6	Negativo
7	Negativo
8	Negativo
9	Negativo
10	Negativo
11	Negativo
12	Negativo

Lote problema N° 5 Dispersión de clonazepam a pH 7

Tabla 25: Resultados de la Prueba de Tracción, lote problema N° 5.

Ratón	+/-
1	Negativo
2	Negativo
3	Negativo
4	Negativo
5	Negativo
6	Negativo
7	Negativo
8	Negativo
9	Negativo
10	Negativo
11	Negativo
12	Negativo

Datos ANOVA

En el siguiente apartado se verifican estadísticamente los resultados obtenidos tanto de entradas en brazos abiertos y tiempo e permanencia en estos, mediante un análisis de varianza (ANOVA).

PORCENTAJE DE ENTRADAS EN BRAZOS ABIERTOS.

Supuestos:

Los siete conjuntos de datos forman muestras aleatorias simples e independientes, extraídas de 7 poblaciones que son similares excepto por la condición estudiada. Se supone que las siete poblaciones de medición siguen una distribución normal con variancias iguales.

Planteamiento de Hipótesis para número de entradas en brazos abiertos:

$H_0 = \mu_{\text{Lote blanco}} = \mu_{\text{Nanoparticulas con clonazepam (0.1mg/Kg)}} = \mu_{\text{Nanoparticulas con clonazepam (0.05mg/Kg)}} = \mu_{\text{Nanoparticulas sin pa.}} = \mu_{\text{Lipido disperso en agua macerado.}} = \mu_{\text{Dispersión de clonazepam a pH 7.}}$ En promedio las seis condiciones producen la misma respuesta.

H_1 = No todas las μ son iguales (al menos una condición produce una respuesta promedio diferente al promedio de cuando menos una de las demás condiciones).

Datos:

Tabla N° 26 porcentajes de entradas en los brazos abiertos.

Ratón	Lote blanco	Lote problema N° 1	Lote problema N° 2	Lote problema N° 3	Lote problema N° 5	Lote Problema N° 6
1	0.0	50.0	16.7	27.3	25.0	0.0
2	10.0	39.3	28.6	0.0	0.0	18.2
3	35.0	63.2	50.0	41.7	0.0	14.3
4	0.0	30.0	33.3	16.7	0.0	7.7
5	0.0	35.0	40.0	53.3	0.0	0.0
6	0.0	100.0	80.0	50.0	0.0	0.0
7	23.1	50.0	16.7	27.3	25.0	0.0
8	0.0	39.3	28.6	0.0	0.0	18.2
9	42.9	63.2	50.0	41.7	0.0	14.3
10	0.0	30.0	33.3	16.7	0.0	7.7
11	12.5	35.0	40.0	53.3	0.0	0.0
12	18.2	100.0	80.0	50.0	0.0	0.0

La F-prueba en la tabla de ANOVA probará si hay algunas diferencias significativas entre las medias.

Tabla N° 27 Análisis de varianza de los porcentajes de entradas en brazos abiertos.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	24410.6	5	4882.13	16.08	0.0000
Within groups	20043.4	66	303.688		
Total (Corr.)	44454.1	71			

La tabla de ANOVA descompone la variación de los datos en dos componentes: un componente entre grupo y un componente dentro de grupo. El F-ratio que en este caso es 16.0761, es un cociente de la estimación cuadrado medio entre los grupos y el cuadrado medio dentro de los grupos. Puesto que el p-value de la prueba de F es menor a 0.05, hay una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los seis grupos con un nivel de confianza de 95.0%

Por lo tanto:

Se rechaza H_0 dado que se concluye que la H_1 es verdadera. Es decir, se concluye que los seis grupos no tienen el mismo comportamiento en promedio.

PORCENTAJE DE TIEMPO DE PERMANENCIA EN LOS BRAZOS ABIERTOS.

Supuestos:

Los siete conjuntos de datos forman muestras aleatorias simples e independientes, extraídas de seis poblaciones que son similares excepto por la condición estudiada. Se supone que las siete poblaciones de medición siguen una distribución normal con variancias iguales.

Planteamiento de Hipótesis para número de entradas en brazos abiertos:

$H_0 = \mu_{\text{Lote blanco}} = \mu_{\text{Nanopartículas con clonazepam (0.1mg/Kg)}} = \mu_{\text{Nanopartículas con clonazepam (0.05mg/Kg)}} = \mu_{\text{Nanopartículas sin pa.}} = \mu_{\text{Lípido disperso en agua macerado.}} = \mu_{\text{Dispersión de clonazepam a pH 7.}}$ En promedio las seis condiciones producen la misma respuesta.

$H_1 =$ No todas las μ son iguales (al menos una condición produce una respuesta promedio diferente al promedio de cuando menos una de las demás condiciones).

Datos:

Tabla Nº 28 porcentajes de entradas en los brazos cerrados.

Ratón	Lote blanco	Lote problema Nº 1	Lote problema Nº 2	Lote problema Nº 3	Lote problema Nº 5	Lote Problema Nº 6
1	0.0	49.3	2.8	12.9	13.5	0.0
2	4.0	41.7	5.1	0.0	0.0	5.0
3	38.6	70.9	19.4	31.6	0.0	20.7
4	0.0	12.0	9.7	11.2	0.0	1.5
5	0.0	25.7	39.0	43.0	0.0	0.0
6	0.0	99.7	50.4	40.3	0.0	0.0
7	19.1	49.3	2.8	12.9	13.5	0.0
8	0.0	41.7	5.1	0.0	0.0	5.0
9	20.0	70.9	19.4	31.6	0.0	20.7
10	0.0	12.0	9.7	11.2	0.0	1.5
11	31.1	25.7	39.0	43.0	0.0	0.0
12	17.4	99.7	50.4	40.3	0.0	0.0

La F-prueba en la tabla de ANOVA probará si hay algunas diferencias significativas entre las medias.

ANOVA Table

Tabla Nº 29 Análisis de varianza de los porcentajes de tiempo de permanencia en brazos abiertos,

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	18370.1	5	3674.01	12.12	0.0000
Within groups	20010.0	66	303.182		
Total (Corr.)	38380.1	71			

La tabla de ANOVA descompone la variación de los datos en dos componentes: un componente entre grupo y un componente dentro de grupo. El F-ratio que en este caso es 12.1182, es un cociente de la estimación cuadrado medio entre los grupos y el cuadrado medio dentro de los grupos. Puesto que el p-value de la prueba de F es menor a 0.05, hay una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los 6 grupos con un nivel de confianza de 95.0%

Por lo tanto:

Se rechaza H_0 dado que se concluye que la H_1 es verdadera. Es decir, se concluye que los seis grupos no tienen el mismo comportamiento en promedio.

VII. Discusión.

Los seis conjuntos de datos forman muestras aleatorias independientes estadísticamente, las seis poblaciones siguen una distribución normal con variancias iguales (tabla N° 3) por lo que se realizaron pruebas de contraste de hipótesis, suponiendo como hipótesis nula que los seis sistemas no tienen una diferencia significativa y como hipótesis alternativa que los seis lotes difieren en su respuesta. En todos los casos se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa. Una realizado el análisis estadístico de las medias de los datos de cada sistema por regiones del modelo en base a número de entradas y tiempo de permanencia, se expresa en las figuras 15 y 16 como porcentajes en referencia a un total de cada sistema considerado como la suma de entradas o tiempo de permanencia en los brazos cerrados y abiertos del modelo de Plus Maze, en este estudio solo nos interesan los resultados obtenidos de los brazos abiertos.

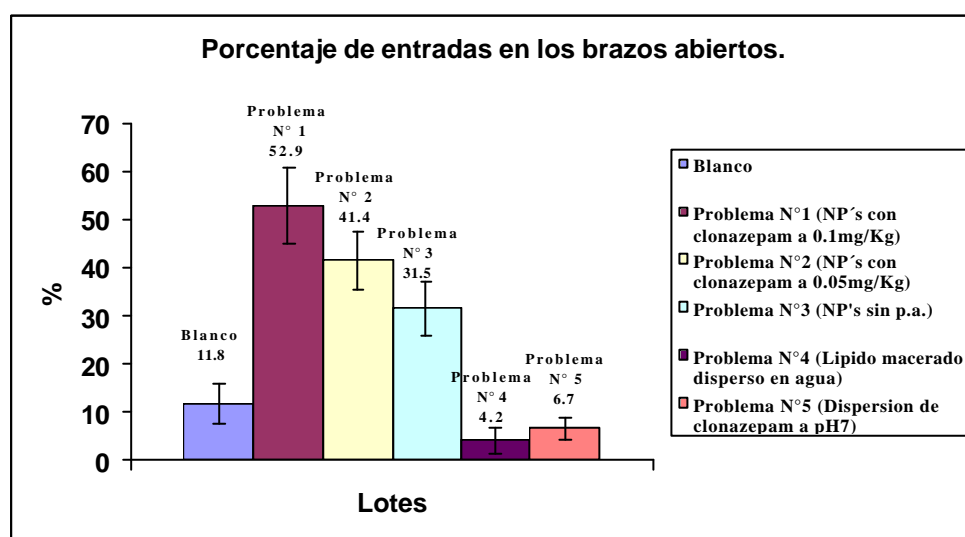


Fig. 14 Porcentaje de entradas en los brazos abiertos de el lote blanco, NP's a (0.1mg/Kg.), NP's a (0.05mg/Kg.), NP's sin p.a., lípido disperso en agua macerado y clonazepam disperso en agua a pH7.

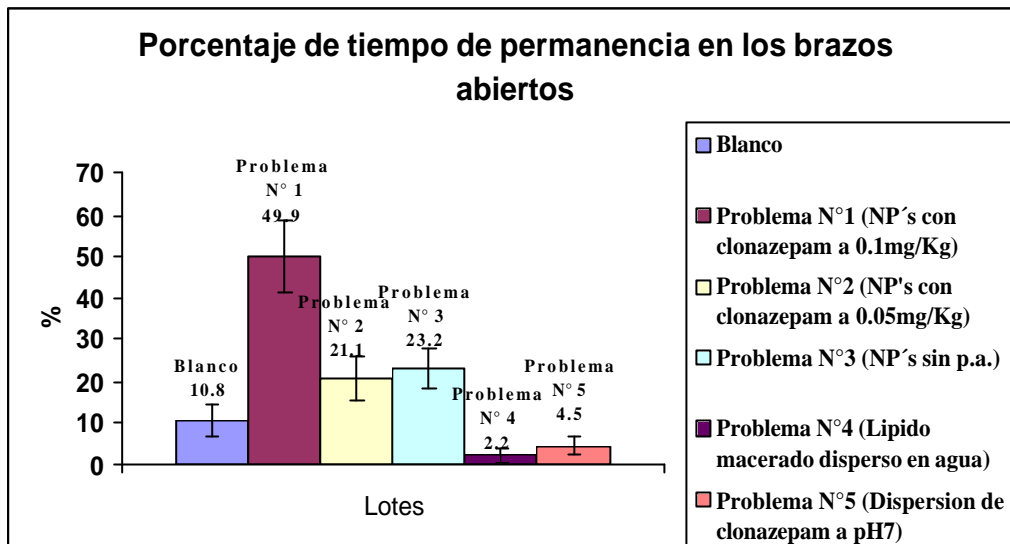


FIG. 15 Porcentaje de tiempo de permanencia en los brazos abiertos de el lote blanco, NP's a (0.1mg/Kg.), NP's a (0.05mg/Kg.), NP's sin p.a., lípido disperso en agua macerado y clonazepam disperso en agua a pH 7.

Como podemos observar en la figura 15, la preparación con mayor porcentaje de entradas en los brazos abiertos es la que corresponde al lote de nanoesferas lipídicas conteniendo al clonazepam administrado en la cantidad especificada para producir un efecto terapéutico: (0.1mg/KG) con un porcentaje de 52.9, y la preparación de nanoparticulas con la mitad de esta dosis (0.05mg/Kg.) presenta un porcentaje de entradas en los brazos abiertos un poco menor 41.4.

En la figura 16 también podemos observar que las nanoesferas lipídicas con clonazepam a una dosis de 0.1mg/k.o. son las que producen el mayor porcentaje de permanencia en los brazos abiertos (49.9), es decir producen un mayor efecto ansiolítico. Cuando se administro a la mitad de la dosis terapéutica el efecto ansiolítico producido según el porcentaje de permanencia en los brazos abiertos es aproximadamente la mitad de cuando se administran nanoesferas lipídicas a una dosis terapéutica con 21.1. se puede decir que cuando se admiistró nanoesferas lipídicas con clonazepam a la mitad de la dosis terapéutica se logró un efecto ansiolítico pero no fue sostenido, por la poca permanencia observada en los brazos abiertos.

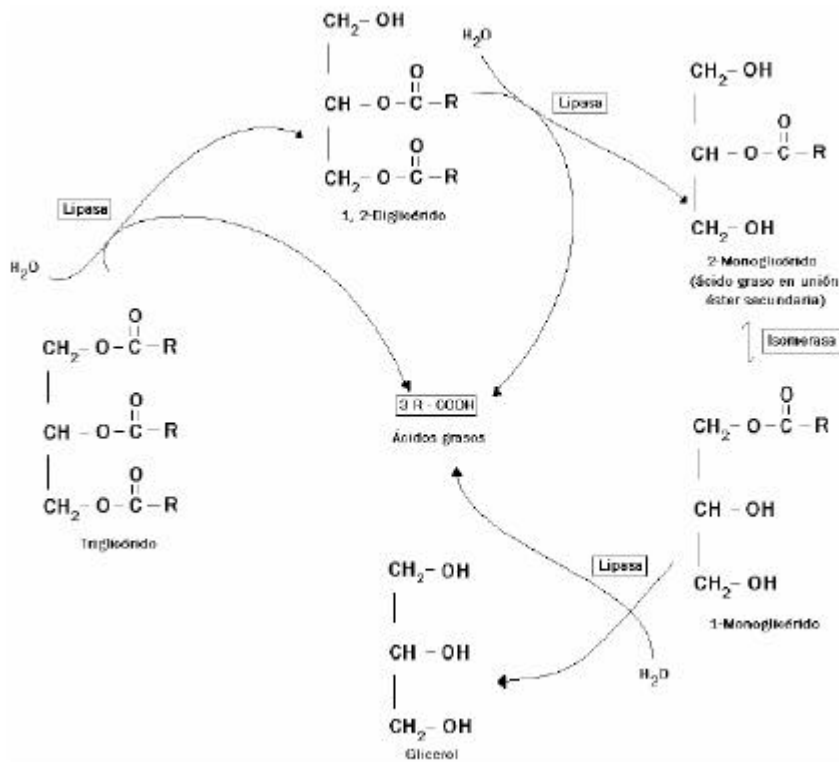
Las preparaciones del lote blanco, nanoparticulas sin principio activo y lípido disperso en agua sirvieron como lotes de referencia que no deberían de

presentar entradas en brazos abiertos (no inducen efecto ansiolítico), la dispersión de clonazepam a pH 7 es un sistema simple con potencial efecto terapéutico. Tomando como referencia el número de entradas del lote blanco, se observa que aún este lote presenta un porcentaje de entradas a los brazos abiertos de 11.8, es decir que dentro del comportamiento natural de los ratones cabe la exploración en espacios de peligro y no su limitación completa al refugio. La dispersión de clonazepam tuvo un porcentaje de entradas similar al lote blanco (11.8 y 6.7 respectivamente) a partir de lo cual se puede concluir que no existe un efecto ansiolítico cuando el fármaco es administrado de esta manera, aún, si el efecto registrado correspondiera a un efecto efectivamente ansiolítico significaría que el clonazepam es absorbido por su forma ionizada. Observando la figura 16 nos podemos dar cuenta que el efecto ansiolítico producido por este sistema es incluso menor que el lote control, en otras palabras, demuestra no tener un efecto ansiolítico.

Para los lotes de lípido macerado en agua y nanopartículas blanco, el porcentaje de entradas en los brazos abiertos como un posible efecto ansiolítico quedaría descartado si se debe a un efecto de digestión de grasas ya que el Compritol ATO 888 que constituye la matriz lipídica es una grasa, éster de ácido graso con glicerol, figura 17. En el páncreas la presencia del quimo ácido (contenido del estómago que pasa intermitentemente durante la digestión hacia el duodeno a través del píloro, los conductos pancreáticos y colédoco se abren en el duodeno en un punto cercano al píloro. El contenido muy alcalino de las secreciones pancreática y biliar neutraliza el ácido del quimo y hace virar el pH de este material hacia la alcalinidad. Este cambio en el pH es necesario para la acción de las enzimas contenidas en los jugos pancreáticos e intestinal) activa al duodeno para producir : Secretina que estimula hormonalmente al flujo del jugo pancreático y Pancreozimina, que estimula la producción de la enzima lipasa (esteapsina) cuyo sustrato son las uniones éster primarias de las grasas (presente en los mono, di y triglicéridos que constituyen al Compritol ATO 888), los productos finales son ácidos grasos, monoglicéridos y glicerol, para ser absorbidos hacia el torrente sanguíneo. En hígado y vesícula biliar las enzimas, sales biliares y álcalis son producidas después de que las hormonas del intestino colecistocinina y hepatocrinina estimulan la vesícula biliar y al hígado, su sustrato es la grasa que puede ser el (Compritol ATO 888) y

también neutraliza el quimo ácido, el producto final es un conjugado de ácidos grasos con sales biliares, emulsiona finalmente a grasa neutra.

La hidrólisis completa de las grasas (triglicéridos) produce glicerol y ácidos grasos. Sin embargo la hidrólisis del primero, del segundo y del tercer ácido de los triglicéridos se realiza con creciente dificultad, necesitándose condiciones especiales para la remoción del último ácido graso (la mayor parte de los constituyentes del Compritol ATO 888 son diglicéridos, este paso sería el principal para convertirlo hasta ácidos grasos y glicerol, su digestión sería entonces lenta). La lipasa pancreática es específica para la hidrólisis de las uniones éster primarias; por esta razón, en la digestión de un triglicérido por la lipasa ocurriría primero la separación de un ácido graso Terminal para producir un 1,2-diglicerido y después se separaría el otro ácido graso Terminal para producir un 2-monoglicérido. Puesto que este último ácido graso está unido por un grupo éster secundario, su remoción requiere la isomerización a una unión éster primaria. Esto constituye una reacción relativamente lenta (aproximadamente 50% de la digestión del Compritol ATO 888 generaría una isomerización de 2-monoglicerido a 1-monoglicérido para completar la digestión) por lo cual resulta, que los monoglicéridos constituyen los principales productos finales de la digestión de las grasas, ya que menos e la tercera parte de la grasa ingerida es completamente demolida hasta glicerol y ácidos grasos. Este motivo explica porque se observa un aparente efecto atenuado ansiolítico en los ratones, mientras que en realidad es muy probable al mecanismo de digestión [72].



• Fig. 17. Mecanismo de digestión de mono, di y triglicéridos. [72]

Este mismo mecanismo es tomado para explicar la digestión de las nanoesferas lipídicas, además de tomar en cuenta las propiedades adhesivas de los lípidos a las paredes intestinales, en esta región pueden estar ocurriendo principalmente dos mecanismos simultáneos de interacción con las (NP's figura 18), considerando que la composición del Compritol ATO 888 es de 12-18% de monoglicéridos, 52-54% de diglicéridos y un 28-32% de triglicéridos: Una fracción de nanoesferas puede adherirse a la pared intestinal y sufrir una ligera acción por parte de la lipasa, alguna fracción de diglicéridos y triglicéridos es degradada hasta monoglicéridos mientras que se da una liberación de fármaco entrampado en esta región de la nanopartícula degradada, finalmente es absorbida y pasa casi sin una modificación estructural importante al torrente sanguíneo.

Mientras que una fracción de nanoesferas logra adherirse a la pared intestinal otra fracción de nanopartícula es degradada casi completamente por la lipasa, el metabolismo de triglicéridos y diglicéridos hasta monoglicéridos, ácidos grasos y glicerol es completado. Después, otra fracción de nanopartículas o residuo de nanopartículas puede ser emulsificado por las sales biliares y álcalis y ser absorbido.

La absorción de nanoesferas lipídicas en la pared intestinal puede verse como un mecanismo saturable, la primera fracción logra la adhesión sin degradación considerable y la última fracción que satura el mecanismo de absorción sufre una degradación considerable.

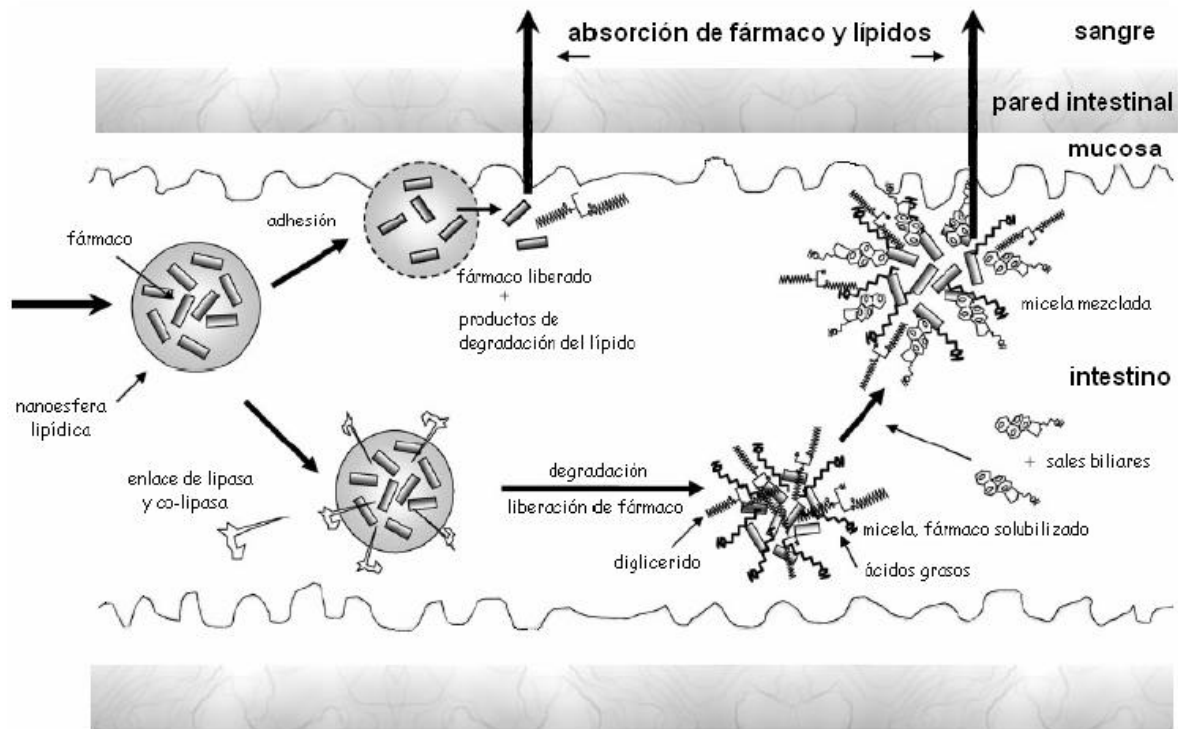


Fig. 18 Mecanismo del efecto de promoción de absorción de lípidos. [70]

Estos dos mecanismos que podrían estar ocurriendo de manera simultánea explican el incremento en la absorción del fármaco debido a la composición matricial de las nanoesferas utilizadas en esta investigación [70].

Debido a que el glicerol es hidrosoluble, es fácilmente absorbido por el intestino pero los ácidos grasos y los monoglicéridos, poco solubles en un medio acuoso requieren de un mecanismo auxiliar para su absorción. La combinación de las sales biliares con los ácidos grasos produce un producto soluble (los complejos hidrotrópicos), que pueden ser absorbidos en la luz del intestino por las células de la mucosa que reviste sus paredes. Después de que los complejos de ácidos grasos con sales biliares y el glicerol han pasado las células de la mucosa intestinal, el ácido graso es liberado de la sal biliar y se recombina con el glicerol para resintetizar una grasa neutra (se resintetizan los triglicéridos).

Ante los dos mecanismos explicados anteriormente de posible absorción de nanoesferas lipídicas, cabe otra posibilidad. La grasa no hidrolizada puede ser absorbida si se encuentra dispersa como partículas muy finas (menores de 500nm) [72]. Y las NP's propuestas son menores a este tamaño, por lo tanto, una fracción puede atravesar sin modificaciones exclusivamente por su tamaño.

Finalmente las nanoesferas que pasaron casi intactas por la pared intestinal (efecto de Caballo Troyano) hacia el torrente sanguíneo son distribuidas por todo el organismo y llegan a estar en contacto con la BHE. La parte que paso como emulsificada es resintetizada triglicéridos, es una reacción enzimática específica, por lo que el fármaco atrapado en las micelas o complejos hidrotrópicos es muy probable que sea liberado al torrente sanguíneo y viaje como fracción libre y unido a proteínas, los triglicéridos resintetizados también se unen a proteínas formando los quilomicrones, son partículas lipoproteicas con tamaño cercano a 1 micrómetro. De esta manera una aportación al efecto terapéutico final observado en el ratón es por el fármaco libre (unido a proteínas y complétame libre) en el torrente sanguíneo que es como queda dispuesto después de la administración en una forma farmacéutica convencional (tabletas), y la segunda y la segunda, el fármaco contenido o entrampado en nanoesferas lipídicas que se encuentran en el torrente sanguíneo y dispuesto como parte de una distribución corporal de manera general para atravesar la BHE.

Mientras las pequeñas moléculas de fármaco entran normalmente a las células por difusión, este no es generalmente el caso para fármacos formulados en nanopartículas. Los fármacos que son formulados en acarreadores nanoparticulados atraviesan la BHE por procesos endocitóticos más que por difusión, primero interactúan con la membrana celular y después son endocitados en vesículas. La nanopartícula es degradada y el fármaco es liberado. Se ha demostrado que acarreadores de fármacos estabilizados con poloxámeros sensibilizan al grupo de proteínas que muestran resistencia al paso de fármacos [73], estos muestran menos impedimento al paso de estas partículas, y por tanto se mejora el paso del acarreador y el efecto terapéutico en el cerebro. También se ha demostrado que el poloxámero disminuye el

secuestro de fármaco por vesículas pinocíticas e inhibe el sistema de detoxificación de glutatión S-transferasa, que impide el paso de fármacos [73]. Para el incremento del efecto terapéutico se proponen los siguientes mecanismos:

- Cruzar el endotelio capilar cerebral que forma la BHE por difusión o mediado por receptores específicos.
- Penetrando los capilares fenestrados de los órganos circunventriculares.
- El fármaco puede ser fagocitado. Se cree que posible que los productos de degradación de nanopartículas pueden actuar como promotores de absorción [74].

Se tiene documentado que las nanoesferas lipídicas incrementan la absorción oral de fármacos liposolubles y que además es importante el efecto del estabilizante sobre la absorción en diferentes barreras. El tween 80 y el F-68 incrementan la absorción oral de fármacos liposolubles incluidos en nanoesferas lipídicas., y disminuyen la actividad de la glicoproteína P y el citocromo P450. Cabe destacar que la glicoproteína P es una de las que constituyen al amplio grupo de proteínas que muestran resistencia al paso de fármacos en la BHE y que modula a bombas de transporte activo primario, por lo que si el pluronic F-68 la inhibe, posiblemente también el poloxámero 407 que son de composición casi igual. Las nanoesferas lipídicas cargadas con clonazepam podrían atravesar también vía transporte activo primario. Las nanoesferas lipídicas también protegen al fármaco de degradación enzimática. [75, 76, 77]. Se ha reportado que las nanoesferas lipídicas pueden mostrar más adsorción de apolipoproteína A que la apolipoproteína B y de esta manera las nanopartículas son transportadas por el torrente sanguíneo sin sufrir degradación, y en la BHE existen receptores para apolipoproteína A que aumentan el paso de las nanopartículas recubiertas con la adsorción de apolipoproteína A, se da el efecto de caballo troyano [78].

Con lo mencionado anteriormente, podemos observar que no existe un mecanismo predominante para el paso de nanopartículas conteniendo fármacos hacia el cerebro a través de la BHE. Existen diferencias atribuidas al tamaño de partícula, composición matricial, agente estabilizante superficial,

fármaco encapsulado, y a la forma en que el fármaco es incluido (diferente si es entrampado o adsorbido) puesto que según la especificidad del fármaco a receptores de la BHE podrá ser impedido más fácilmente si se encuentra adsorbido o viceversa. Se pueden proponer los siguientes mecanismos probables para nanoesferas lipídicas:

- Las nanopartículas transportan al fármaco cuando llegan a la BHE y entran en contacto con las membranas celulares (con su alta adhesión) son endocitadas, en el interior de las células son degradadas y el fármaco empieza a liberarse (posiblemente parte del fármaco también es degradado), esta fracción libre puede atravesar por difusión la membrana celular y fluir al medio cerebral.
- La apolipoproteína A o en todo caso la apolipoproteína B pueden recubrir a las nanopartículas conteniendo al fármaco, estas pasan casi intactas después del proceso digestivo, viajan por la circulación general y cuando entran en contacto con la BHE, en donde hay receptores para apolipoproteína A y B son anclados, atraviesan las nanopartículas la BHE en forma enmascarada, en el interior del cerebro cualquiera de las apolipoproteínas son catalizadas y las nanopartículas son degradadas liberando al fármaco.
- El poloxámero 407 adsorbido sobre las nanoesferas lipídicas puede estar sensibilizando a varios receptores (pinocitosis) e inhibiendo la actividad de otros (sistemas de detoxificación de glutathion S transferasa, glicoproteína P), de esta forma, disminuye la barrera metabólica y se incrementa el paso de nanopartículas por canales de transporte.
- Difusión simple de las nanopartículas, penetrando los capilares fenestrados.

Es posible que estos mecanismos se den simultáneamente y posiblemente los productos de degradación de las nanopartículas provenientes de la digestión y que fueron absorbidos y resintetizados, puedan actuar como promotores de absorción.

VIII. CONCLUSIONES

- ❖ Se pudo demostrar el efecto ansiolítico del diazepam obtenido en ratones macho albino utilizando el modelo de Plus Maze al cuantificar el número de entradas y tiempos de permanencia en los brazos abiertos.
- ❖ Se logró determinar el efecto ansiolítico de las NP's con clonazepam a las dosis media terapéutica y terapéutica, observando que esta última se obtuvo un efecto ansiolítico mayor

IX. PERSPECTIVAS

El trabajo realizado solo es una pequeña porción de toda la investigación que requerirá el estudio de las nanopartículas lipídicas con clonazepam, ya que solo nos enfocamos en la evaluación de su efecto en ratones, en un tiempo de 15 minutos después de su administración y en dos dosis. Con esto el camino se abre a nuevas áreas encaminadas a la evaluación *in vivo* tales como:

- i. Comparar el efecto a diferentes tiempos de administración con la finalidad de saber si a los 15 minutos se tiene el mayor efecto o menor.
- ii. Comparar el efecto ansiolítico a partir de nanopartículas preparadas a partir de diferentes matrices lipídicas y estabilizantes.
- iii. Estudiar la liberación *in Vitro* para corroborar el presente estudio.
- iv. Comparar el efecto obtenido de Np's Lipídicas con Clonazepam y otras de formulaciones comerciales.
- v. Evaluar su administración por vía oral e intravenosa.
- vi. Realizar estudios de toxicidad *in vivo* e *in Vitro*, con placebos y con nanoesferas conteniendo el fármaco.

X. REFERENCIAS

1. Statment for the Record on Nanotechnology by departamento f health and human services nacional institutes of health. EUA. Mayo 1, 2003.
2. Quintanar-Guerrero, D. Tamayo-Esquivel, A. Ganem-Quintanar, E. Alléman, E. Doelker, H. Fessi, Adaptation and optimization of the emulsification-diffusion technique to prepare lipidic nanospheres, *Pharm. Sci.*, 26 (2005) 211-218 .
3. R.H. Müller, et al., Solid Lipid Nanoparticles for controlled drug delivery – a review of the state of the art, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 50 (2000) 161-177.
4. M. Trotta, et al., Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification-diffusion technique, *Int. J. Pharm.*, 7453 (2003) 1-8
5. Quintanar-Guerrero, E. Alléman, E. Doelker, H. Fessi, A mechanistic study of the formation of polymer nanoparticles by the emulsification-diffusion technique, *Colloid. Polym. Sci.*, 275 (1997) 640-647.
6. Litter Manuel. Compendio de Farmacología. Ed. El Ateneo. 4°ed. 1992 Argentina. pp. 70-80.
7. <http://www.mtas.es/insht/EncOIT/pdf/tomo1/7.pdf>
8. <http://www.anatomia.tripod.com/sistemanervioso.htm>
9. Flórez Jesús, Armijo Antonio Juan, Mediavilla África. “Farmacología Humana”. Ed Masson. Barcelona España. 2003
10. Kalant Harold, Roschlau E.H. Walter. “Farmacología Médica”. Sexta edición, Ed. OXFORD. México 2002. pp 225-229.
11. Fernández Mendoza Víctor, Análisis de las acciones ansiolíticas de la melatonina en rata, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, Año 1993, 1928
12. Avitia Hernández Eloina Eva, Analisis de las acciones ansiolíticas de la melatoina y el 5-hidroxitriptofol en la rata, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, Año 1996, pp 16-17.
13. A. Goodman Gilman, Las bases farmacológicas de la terapéutica. 10ª ed. McGraw-Hill Interamericana. México, 2003.
14. Praveen Ballabh, Alex Braun, and Maiken Nedergaard, The blood–brain barrier: an overview Structure, regulation, and clinical implications. *Neu. Dis.*, 16 (2004) 1-13.

15. Arthur C. Guyton, Fisiología humana. Nueva editorial interamericana, México, Sexta edición, 1987, pp. 119-121
16. N. Joan Abbott, Prediction of blood-brain barrier permeation in drug discovery from in vivo, in vitro and silico models. Drug Dis. Today Tech., 1 (2004) 407-416.
17. Anne M. Wolka, Jason D. Huber, Thomas P. Davis, Pain and the bloodbrain barrier: obstacles to drug delivery. Adv. Drug Deliv. Rev., 55 (2003) 987-1006.
18. Hans Lennernäs, Ebba Lundgren, Intestinal and blood-brain drug transport: beyond involvement of a single transport function. Drug Dis. Today Tech., 1 (2004) 417-422.
19. Gert Luurtsema, Elizabeth C. M. de Lange, Adriaan A. Lammertsma, Eric J. F. Franssen, Transport across the blood-brain barrier: stereoselectivity and PET-Tracers. Mol. Imag. Bio., 5 (2004) 306-318.
20. Perez Arroyo Veronica, Estudio Teórico de algunos fármacos pertenecientes al grupo de las benzodiazepinas: Relacion estructura química - actividad biologica, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, Año 2000, pp. 26-31
21. <http://www.benzo.org.uk/espman/bzcha01.htm> (2006)
22. Cardinali, D.P.; Lowenstein, P.R.; Rosenstein, R.E.; Gonzalez Solveyra, C.; Keller Sarmiento, M.I.; Romeo, H.E. y Acuña Castroviejo, D. Functional links between benzodiazepine and GABA receptors and pinenal activity. GABA and Endocrine Function. Giorgio Racagni y Alfredo O. Donoso (eds). Raven Press. New York, 1986, pp. 155 – 164.
23. Tansella, H., y Ogata, N. (1992): GABA-mediated modulation of the voltaje-gated Ca⁺² channels. General Pharmacol., 23: 309 – 316.
24. Leyva Gómez Gerardo, “Evaluación de nanoesferas lipídicas como vector de fármacos ansiolíticos (clonazepam)”, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan. Año 2006.
25. http://med.unne.edu.ar/catedras/farmacologia/temas_farma/volumen5/2_benzodiaz.pdf#search=%22benzodiazepinas%20filetype%3Apdf%22
26. <http://www.eutimia.com/psicofarmacos/ansiolíticos/clonazepam.htm> (2006)
27. Molina, M., Pérez, J. y Olivera, J. (2002). *Female Wistar rats tested during late proestrus or during pregnancy and ovariectomized rats tested*

- after receiving progesterone or allopregnanolone displayed reduced conflict behavior. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol Psychiat.*, 26, 839-844.
28. Molina, M., Téllez, N.P., Pérez, J., Olivera, J. y Jaramillo, T. (2003). Anticonflict-like actions of intra-lateral septal infusions of allopregnanolone in Wistar rats. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, 75, 397-404.
 29. Emamghoreishi Masoumeh, Khasaki, Aazam Fath Maryam, Coriandrum sativum: evaluation of its anxiolytic effect in the elevated Plus – Maze, *Journal of Ethnopharmacology* 96 (2005) 365 – 370.
 30. Kitano Yutaka, Komiyama Chika, Makino Mitsuhiro, Takasuna Kiyoshi, Takazawa Akira, Sakurada Shinobu, Anticonvulsant Properties of the Novel Nootropic Agent Nefiracetam in Seizure Models of Mice and Rats. *Epilepsia*, 46 (6): 811-818, 2005.
 31. Yasuda Tsuneo, Miki Shinya, Yoshinaga Norihiro, Senba Emiko, Effects of amitriptyline and gabapentin on bilateral hyperalgesia observed in animal model of unilateral axotomy, *Pain* 115 (2005) 161 - 170
 32. Salum, C., Morato, S., and Roque-da-Silva, A. C. (2000), Anxiety-like behavior in rats: a computational model. *Neural Networks*, 13, 21-29.
 33. Treit, D., Menard, J., and Royan, C. (1993), Anxiogenic Stimuli in the Elevated Plus-Maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 44, 463-469.
 34. Kalynchuk, L.E. and Beck, C. H. M. (1992), Behavioral analysis of diazepam-induced memory deficits: Evidence for sedation-like effects. *Psychopharmacology*, 106(3), 297-302.
 35. Kalynchuk, L. E., Pinel, J. P. J., Treit, D., and Kippin, T. E. (1997), Changes in Emotional Behavior Produced by Long-Term Amygdala Kindling in Rats. *Biological Psychiatry*, 41, 438-451.
 36. Rodgers, R. J., Cole, J. C. (1994), The Elevated Plus-Maze: Pharmacology, Methodology and Ethology. *Ethology and Psychopharmacology*, Cooper, S., and Hendrie, C. (Ed.), John Wiley & Sons Ltd, 25-32.
 37. <http://www.psicologiaincientifica.com/publicaciones/biblioteca/articulos/arvires01.htm> (2005)
 38. <http://www.jefferson.edu/neurosurgery/research/images/EPM.jpg>.

39. Lazorthes, Guy, *El cerebro y la mente*. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México, 1987.
40. <http://72.14.253.104/search?q=cache:TEjgBKn0YtwJ:es.wikipedia.org/wiki/Nanotecnolog%C3%ADa+nanotecnologia&hl=es&gl=es&ct=clnk&cd=2>
41. Gabriel A. Silva, Neuroscience nanotechnology: progress, opportunities and challenges. *Neuroscience*, 7 (2006) 65-74
42. Claudio Nastruzzi, *Lipospheres in drug targets and delivery*, CRC Press, USA, 2005, pp. 2-4.
43. Eng H. Lo, Aneesh B. Singhal, Vladimir P. Torchilin, N. Joan Abbott, Drug delivery to damaged brain. *Brain Res. Rev.*, 38 (2001) 140-148
44. P. Garberg, M. Ball, N. Borg, R. Cecchelli, L. Fenart, R.D. Hurst, et al, In vitro models for the blood–brain barrier. *Tox. In Vitro*, 19 (2005) 299-334.
45. Nicholas Bodor, Peter Buchwald, Recent advances in the targeting of neuropharmaceuticals by chemical delivery systems. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 36 (1999) 229-254.
46. Lizbeth Illum, Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 11 (2000) 1-18.
47. Gabor Somogyi, Sinji Nishitani, Daishuke Nomi, Peter Buchwald, Laszlo Prokai, Nicholas Bodor, Targeted drug delivery to the brain via phosphonate derivatives I. Design, synthesis and evaluation of an anionic chemical delivery system for testosterone. *Int. J. Pharm.*, 166 (1998) 15-26.
48. Christophe Jollivet, Anne Aubert-Pouessel, Anne Clavreul, Marie-Claire Venier-Julienne, Séverine Remy, Claudia N. Montero-Menei, Jean-Pierre Benoit, Philippe Menei, Striatal implantation of GDNF releasing biodegradable microspheres promotes recovery of motor function in a partial model of Parkinson´s disease. *Biomaterials*, 25 (2004) 933-942
49. Jean-Pierre Benoit, Nathalie Faisant, Marie-Claire Venier-Julienne, Philippe Menei, Development of microspheres for neurological disorders: From basics to clinical applications. *J. Control. Rel.*, 65 (2000) 285-296.
50. Donald Wong, Katerina Dorovini-Zis, Steven R. Vincent, Cytokines, nitric oxide, and cGMP modulate the permeability of an in vitro model of the human blood–brain barrier. *Exp. Neu.*, 190 (2004) 446-455.
51. Brian T. Hawkins, Thomas J. Abbruscato, Richard D. Egleton, Rachel C. Brown, Jason D. Huber, Nicotine increases in vivo blood–brain barrier

- permeability and alters cerebral microvascular tight junction protein distribution. *Brain Res.*, 1027 (2004) 48-58.
52. P. R. Lockman, R. J. Mumper, M. A. Khan, D. D. Allen, Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 28 (2002) 1-13.
53. Brigitte Cosquer, Anne Pereira de Vasconcelos, Jürg Fröhlich, Jean-Christophe Cassel, Blood–brain barrier and electromagnetic fields: Effects of scopolamine methylbromide on working memory after whole-body exposure to 2.45 GHz microwaves in rats. *Behavioural Brain Res.*, 161 (2005) 229-237
54. Rachel C. Brown, Richard D. Egleton, Thomas P. Davis, Mannitol opening of the blood–brain barrier: regional variation in the permeability of sucrose, but not $^{86}\text{Rb}^+$ or albumin. *Brain Res.*, 1014 (2004) 221-227.
55. Alekha K. Dash, William F. Elmquist, Separation methods that are capable of revealing blood-brain barrier permeability. *J. Chromatogr.*, 797 (2003) 241-254
56. Quintanar-Guerrero D., Allémann E. Fessi H., Doelker E., Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 24 (1998) 1113-1117
57. David J. Begley, Michael W. Bradbury, Jörg Kreuter, The blood-brain barrier and drug delivery to the CNS. Marcel Dekker, Inc., New York, 2000
58. Jörg Kreuter, Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 47 (2001) 65-81
59. Rainer H. Müller, Cornelia M. Keck, Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs – a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles. *J. Biotech.*, 113 (2004) 151-170.
60. Gupta P. K., Hung C. T., Quantitation of the release of doxorubicin from colloidal carrier for controlled drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 41 (1995) 62-69
61. Rainer H. Müller, Cornelia M. Keck, Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs – a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles. *J. Biotech.*, 113 (2004) 151-170.
62. Sylvia A. Wissing, Rainer H. Müller, Cosmetic applications for solid lipid nanoparticles (SLN). *Int. J. Pharm.*, 254 (2003) 65-68

63. Wolfgang Mehnert, Karsten Mäder, Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 47 (2001) 165-196.
64. S. A. Wissing, O. Kayser, R. H. Müller, Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 56 (2004) 1257-1272.
65. Roberta Cavalli, M. Rosa Gasco, Patrizia Chetoni, Susi Burgalassi, M. Fabricio SAetone, Solid lipid nanoparticles (SLN) as ocular delivery system for tobramycin. *Int. J. Pharm.*, 238 (2002) 241-245.
66. M. A. Schubert, C. C. Müller-Goyman, Characterisation of surface-modified solid lipid nanoparticles (SLN): Influence of lecithin and nonionic emulsifier. *Eur. J. Pharm. And Biopharm.*, 61 (2005) 77-86.
67. Béatrice Heurtault, Patrik Saulnier, Brigitte Pech, Jacques-Emile Proust, Jean-Pierre Benoit, Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials*, 24 (2003) 4283-4300.
68. C. Gutiérrez Escamilla, Potencial uso de la técnica de emulsificación y difusión en la elaboración de nanocápsulas lipídicas. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México (2005).
69. Soo-Jeong Lim, Chong-Kook Kim, Formulation parameters determining the physicochemical characteristics of solid lipid nanoparticles loaded with all-trans retinoic acid. *Int. J. Pharm.*, 243 (2002) 135-146
70. N. Schöler, H. Hahn, R. H. Müller, O. Liesenfeld, Effect of lipid matrix and size of solid lipid nanoparticles (SLN) on the viability and cytokine production of macrophages. *Int. J. Pharm.*, 231 (2002) 167-176.
71. D. Hou, Ch. Xie, K. Huang, Ch. Zhu, The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs). *Biomaterials*, 24 (2003) 1781-1785.
72. Harper Harold A. , *Manual de Química Fisiológica. El Manual Moderno S.A. , México 1965).*
73. Andreas G. Schätzlein, Delivering Cancer ítem cell therapies – A role for nanomedicines? *Eu. J. Cancer*, 42 (2006) 1309-1315.
74. Ulrike Schroeder, Petra Sommerfeld, Bernhard A. Sabel, Efficacy of oral delargin-loaded nanoparticle delivery across the blood-brain barrier. *Peptides*, 4 (1997) 777-780.
75. Torsten M. Göppert, Rainer H. Müller, Protein adsorption patterns on poloxamer – and poloxamine – stabilized solid lipid nanoparticles (SLN). *Eur. J. Pharm. And Biopharm.*, 60 (2005) 361-372.

76. Ikumi Tamai, Akira Tsuji, Drug delivery through the blood-brain barrier. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 19 (1996) 401-424.
77. YiFan Luo, DaWei Chen, LiXiang Ren, XiuLi Zhao, Jing Qin, Solid lipid nanoparticles for enhancing vinpocetine's oral bioavailability. *J. Cont. Rel.*, 114 (2006) 53-59.
78. A. Gessner, C. Olbrich, W. Schröder, O. Kayser, R. H. Müller, The role of plasma proteins in brain targeting: species dependent protein adsorption patterns on brain-specific lipid drug conjugate (LDC) nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, 214 (2001) 87-91