



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**  
**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

“EVALUACIÓN MEDIANTE ELECTROENCEFALOGRAFÍA DEL EFECTO  
ANTICONVULSIVO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS DE ÁCIDO  
ESTEÁRICO CARGADAS CON FENITOÍNA”

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

LF. ALEJANDRO ORTIZ SANTIAGO

TUTOR DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO 2021



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

Universidad Nacional Autónoma de México.

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas.

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

Facultad de Química, UNAM.

Tutor: Dr. David Quintanar Guerrero, FES-Cuautitlán, UNAM.

Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología No. CVU: 846376

Proyecto PIAPI 2040

Proyecto PAPIIT IN222420

Dra. María Eva Gonzales Trujano.

Laboratorio de Neurofarmacología de Productos Naturales.

Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz.

Dr. David Martínez Vargas.

Laboratorio de Neurofisiología del Control y la Regulación.

Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz.

Jurado:

Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira.

FES-Cuautitlán, UNAM.

Dra. Luz María Melgoza Contreras.

UAM-Xochimilco.

Dr. Emilio Bucio Carrillo

Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM.

Dra. Helgi Helen Francisca Jung Cook.

Facultad de Química, UNAM.

Dra. Yareli Rojas Aguirre

Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM

## Contenido

Índice de figuras .....	7
Índice de tablas .....	9
Símbolos y abreviaturas .....	12
1. Antecedentes .....	13
2. Marco teórico .....	15
2.1. Generalidades sobre epilepsia .....	15
2.1.1. Antecedentes históricos .....	15
2.1.2. Definición de epilepsia .....	16
2.1.3. Tipos de crisis .....	17
2.1.3.1. Crisis focales .....	17
2.1.3.2. Crisis generalizadas .....	18
2.1.4. Principales causantes de epilepsia .....	19
2.1.5. Repercusiones emocionales y sociales .....	20
2.2. Barrera hemato-encefálica .....	20
2.2.1. Características y estructura .....	21
2.2.2. Mecanismos de transporte de sustancias a través de la BHE .....	22
2.3. Nanopartículas como acarreadores de fármacos .....	25
2.3.1. Nanotransportadores lipídicos .....	26
2.4. Nanopartículas Lipídicas Sólidas .....	26
2.4.1. Ácido esteárico .....	28
2.4.2. Métodos de fabricación de NLS .....	28

2.4.2.1. Homogenización al alto corte .....	28
2.4.2.2. Homogenización en caliente .....	29
2.4.2.3. Homogenización en frío .....	29
2.4.2.4. Emulsificación/Evaporación de disolvente .....	29
2.4.2.5. Microemulsión .....	29
2.4.2.6. Inyección de disolvente .....	30
2.4.2.7. Doble emulsión .....	30
2.4.2.8. Fluidos supercríticos .....	30
2.4.3. Caracterización de NLS .....	30
2.4.3.1. Tamaño de partícula y potencial Z .....	31
2.4.3.2. Microscopía electrónica .....	31
2.4.3.3. Eficiencia de encapsulación o entrapamiento .....	31
2.4.3.4. Forma polimórfica y grado de cristalinidad.....	32
2.5. Fármacos anticonvulsivos .....	32
2.5.1. Mecanismo de acción .....	32
2.5.1.1. Inhibición de la excitación sináptica .....	35
2.5.1.2. Modulación de canales iónicos dependientes de voltaje .....	35
2.5.1.3. Potenciación de la inhibición sináptica .....	36
2.5.2. Fenitoína .....	37
2.6. Modelos animales usados en investigación sobre epilepsia .....	38
2.6.1. Clasificación .....	39
2.6.2 Pentilentetrazol .....	42
2.7 Generalidades sobre electroencefalografía .....	42

2.7.1. Principios de funcionamiento .....	43
2.7.2. Frecuencias y ritmos cerebrales .....	44
2.7.3. Morfología de las ondas .....	45
3. Justificación .....	46
4. Hipótesis .....	47
5. Objetivos .....	48
5.1. Objetivo general .....	48
5.2. Objetivos particulares .....	48
6. Desarrollo experimental .....	49
6.1. Reactivos .....	49
6.2. Equipos e instrumentos .....	49
6.3. Fabricación de las nanopartículas .....	50
6.4. Caracterización física .....	51
6.4.1. Tamaño de partícula e Índice de polidispersión .....	51
6.4.2. Potencial Z .....	51
6.4.3. Cuantificación de fármaco encapsulado .....	51
6.5. Cirugía estereotáxica .....	52
6.5.1. Animales .....	52
6.5.2. Colocación de electrodos .....	53
6.6. Medición de la actividad eléctrica cerebral .....	54
6.6.1. Grupos de experimentación .....	54
6.6.2. Registro de los electroencefalogramas e inducción de crisis convulsivas ....	55

6.7. Análisis estadístico .....	56
7. Resultados y discusión .....	57
7.1. Fabricación y caracterización de las NLS .....	57
7.2. Obtención de los registros EEG .....	59
7.2.1. Estado basal .....	59
7.2.2. Tratamientos .....	60
7.2.3. PTZ .....	63
7.3. Evaluación de la actividad anticonvulsiva .....	67
7.3.1. Neck Jerks .....	67
7.3.2. Crisis clónica .....	69
7.3.3. Crisis tónico-clónica .....	75
7.3.4. Muerte .....	81
8. Conclusiones .....	86
9. Perspectivas .....	88
10. Referencias .....	90
11. Anexos .....	108

## INDICE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de la barrera hematoencefálica .....	21
Figura 2. Mecanismos de transporte de sustancias a través de la barrera hemato-encefálica .....	23
Figura 3. Clasificación de los mecanismos de transporte que siguen los sistemas nanoparticulados para cruzar la barrera hemato-encefálica .....	25
Figura 4. Representación esquemática de las nanopartículas lipídicas sólidas .....	27
Figura 5. Estructura química del ácido esteárico .....	28
Figura 6. Principales mecanismos de acción de los fármacos anticonvulsivos .....	34
Figura 7. Estructura química del fármaco anticonvulsivo fenitoína .....	37
Figura 8. Estructura química del fármaco convulsivante pentilentetrazol .....	42
Figura 9. Proceso de fabricación de las NLS por el método de emulsificación en caliente ....	50
Figura 10. Localización de los electrodos implantados en los animales de experimentación	53
Figura 11. Tablilla de conexión o <i>header</i> utilizado como conector entre los implantes y los sistemas de registro EEG .....	54
Figura 12. Diagrama de la línea temporal de registro de la actividad EEG .....	55
Figura 13. Registro EEG en estado basal .....	59
Figura 14. Registro EEG después de administrar la mezcla física .....	60
Figura 15. Registro EEG después de administrar NLS .....	61
Figura 16. Registro EEG después de administrar NLS/PHT .....	62
Figura 17. Registro EEG después de administrar PHT .....	63
Figura 18. Registro EEG después de administrar PTZ. Etapa <i>Neck Jerks</i> .....	64
Figura 19. Registro EEG después de administrar PTZ. Etapa crisis clónica .....	65



Figura 20. Registro EEG después de administra PTZ. Etapa crisis tónico-clónica .....	66
Figura 21. Representación esquemática de la sucesión de los eventos evaluados mediante el registro EEG .....	66
Figura 22. Incidencia de <i>Neck Jerks</i> de cada grupo experimental .....	67
Figura 23. Tiempo de latencia a <i>Neck Jerks</i> de cada grupo experimental .....	67
Figura 24. Incidencia de crisis clónica de cada grupo experimental .....	69
Figura 25. Tiempo de latencia a crisis clónica de cada grupo experimental .....	72
Figura 26. Tiempo de duración de crisis clónica de cada grupo experimental .....	74
Figura 27. Incidencia de crisis tónico-clónica de cada grupo experimental .....	75
Figura 28. Tiempo de latencia de crisis tónico-clónica de cada grupo experimental .....	78
Figura 29. Tiempo de duración de crisis tónico-clónica de cada grupo experimental .....	80
Figura 30. Incidencia de muerte de cada grupo experimental .....	81

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Modelos experimentales de epilepsia .....	40
Tabla 2. Grupos de experimentación para la evaluación del efecto anticonvulsivo .....	54
Tabla 3. Resultados de la caracterización física de las NLS .....	57
Tabla 4. ANOVA para latencia a <i>Neck Jerks</i> por condición .....	68
Tabla 5. Prueba de Múltiples Rangos para latencia a <i>Neck Jerks</i> por condición .....	68
Tabla 6. Frecuencias para Condición/Incidencia crisis clónica. Control vs NLS/PHT .....	70
Tabla 7. Prueba de independencia. Control vs NLS/PHT .....	70
Tabla 8. Frecuencias para Condición/Incidencia crisis clónica. Control vs PHT .....	70
Tabla 9. Prueba de independencia. Control vs PHT .....	70
Tabla 10. Frecuencias para Condición/Incidencia crisis clónica. Mezcla física vs NLS/PHT ....	70
Tabla 11. Prueba de independencia. Mezcla física vs NLS/PHT .....	71
Tabla 12. Frecuencias para Condición/Incidencia crisis clónica. Mezcla física vs PHT .....	71
Tabla 13. Prueba de independencia. Mezcla física vs PHT .....	71
Tabla 14. Frecuencias para Condición/Incidencia crisis clónica. NLS vs NLS/PHT .....	71
Tabla 15. Prueba de independencia. NLS vs NLS/PHT .....	71
Tabla 16. Frecuencias para Condición/Incidencia crisis clónica. NLS vs PHT .....	71
Tabla 17. Prueba de independencia. NLS vs PHT .....	71
Tabla 18. Frecuencias para Condición/Incidencia crisis clónica. NLS/PHT vs PHT .....	72
Tabla 19. Prueba de independencia. NLS/PHT vs PHT .....	72
Tabla 20. ANOVA para latencia a crisis clónica por condición .....	73
Tabla 21. Prueba de Múltiples Rangos para latencia a crisis clónica por condición .....	73
Tabla 22. ANOVA para duración de crisis clónica por condición .....	74

Tabla 23. Prueba de Múltiples Rangos para duración de crisis clónica por condición .....	74
Tabla 24. Frecuencias para Condición/Incidencia crisis tónico-clónica. Control vs NLS .....	75
Tabla 25. Prueba de independencia. Control vs NLS .....	76
Tabla 26. Frecuencias para Condición/Incidencia crisis tónico-clónica. Control vs NLS/PHT .	76
Tabla 27. Prueba de independencia. Control vs NLS/PHT .....	76
Tabla 28. Frecuencias para Condición/Incidencia crisis tónico-clónica. Mezcla física vs NLS	76
Tabla 29. Prueba de independencia. Mezcla física vs NLS .....	76
Tabla 30. Frecuencias para Condición/Incidencia crisis tónico-clónica. Mezcla física vs NLS/PHT .....	76
Tabla 31. Prueba de independencia. Mezcla física vs NLS/PHT .....	76
Tabla 32. Frecuencias para Condición/Incidencia crisis tónico-clónica. NLS/PHT vs NLS .....	77
Tabla 33. Prueba de independencia. NLS/PHT vs NLS .....	77
Tabla 34. Frecuencias para Condición/Incidencia crisis tónico-clónica. NLS vs PHT .....	77
Tabla 35. Prueba de independencia. NLS vs PHT .....	77
Tabla 36. Frecuencias para Condición/Incidencia crisis tónico-clónica. NLS/PHT vs PHT .....	77
Tabla 37. Prueba de independencia. NLS/PHT vs PHT .....	77
Tabla 38. ANOVA para latencia a crisis tónico-clónica por condición .....	79
Tabla 39. Prueba de Múltiples Rangos para latencia a crisis tónico-clónica por condición ...	79
Tabla 40. ANOVA para duración de crisis tónico-clónica por condición .....	80
Tabla 41. Prueba de Múltiples Rangos para duración de crisis tónico-clónica por condición	80
Tabla 42. Frecuencias para Condición/Incidencia muerte. Control vs Mezcla física .....	82
Tabla 43. Prueba de independencia. Control vs Mezcla física .....	82
Tabla 44. Frecuencias para Condición/Incidencia muerte. Control vs NLS .....	82

Tabla 45. Prueba de independencia. Control vs NLS .....	82
Tabla 46. Frecuencias para Condición/Incidencia muerte. Control vs NLS/PHT .....	83
Tabla 47. Prueba de independencia. Control vs NLS/PHT .....	83
Tabla 48. Frecuencias para Condición/Incidencia muerte. Control vs PHT .....	83
Tabla 49. Prueba de independencia. Control vs PHT .....	83
Tabla 50. Frecuencias para Condición/Incidencia muerte. Mezcla física vs NLS .....	83
Tabla 51. Prueba de independencia. Mezcla física vs NLS .....	83
Tabla 52. Frecuencias para Condición/Incidencia muerte. Mezcla física vs NLS/PHT .....	83
Tabla 53. Prueba de independencia. Mezcla física vs NLS/PHT .....	84
Tabla 54. Frecuencias para Condición/Incidencia muerte. Mezcla física vs PHT .....	84
Tabla 55. Prueba de independencia. Mezcla física vs PHT .....	84
Tabla 56. Frecuencias para Condición/Incidencia muerte. NLS/PHT vs NLS .....	84
Tabla 57. Prueba de independencia. NLS/PHT vs NLS .....	84
Tabla 58. Frecuencias para Condición/Incidencia muerte. NLS vs PHT .....	84
Tabla 59. Prueba de independencia. NLS vs PHT .....	84
Tabla 60. Frecuencias para Condición/Incidencia muerte. NLS/PHT vs PHT .....	85
Tabla 61. Prueba de independencia. NLS/PHT vs PHT .....	85

## SIMBOLOS y ABREVIATURAS

a.C.	antes de Cristo	AMPA	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol
ILAE	International League Against Epilepsy	NMDA	N-metil-D-aspartato
SNC	Sistema Nervioso Central	GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
BHE	Barrera Hemato-encefálica	PHT	Fenitoína
$\Omega$	Ohms	pka	Logaritmo negativo de la constante de acidez
cm <sup>2</sup>	Centímetros cuadrados	mg	miligramo
ATP	Adenosin Trifosfato	L	litro
LBD	Lipoproteínas de Baja Densidad	GAERS	Genetic Absence Epilepsy Rat from Strasbourg
ApoE	Apolipoproteína E	WAG/Rij	Wistar Albino Glaxo Rat from Rijswijk
nm	Nanómetro	GEPR	Genetically Epilepsy-Prone Rats
SNEDDS	Self-NanoEmulsifying Drug Delivery System	PTZ	Pentilentetrazol
NLS	Nanopartículas Lipídicas Sólidas	kg	kilogramo
GRAS	Generally Recognized As Safe	EEG	Electroencefalograma
FDA	Food and Drug Administration	Hz	Hertz
bar	bar	$\mu$ V	Microvolts
°C	grados Celsius	AE	Ácido Esteárico
%	por ciento	PVA	Alcohol Polivinílico
m/v	masa/volumen	rpm	revoluciones por minuto
o/w	oil/water	h	hora
w/o	water/oil	mm	milímetro
w/o/w	water/oil/water	cm	centímetro
FS	Fluidos supercríticos	$\mu$ m	micrómetro
RESS	Rapid Expansion of Supercritical Solutions	mL	mililitro
FAC	Fármacos Anti Convulsivos	min	minuto
Na <sup>+</sup>	Sodio	$\mu$ L	microlitro
Ca <sup>2+</sup>	Calcio	NLS/PHT	Nanopartículas Lipídicas Sólidas con fenitoína
K <sup>+</sup>	Potasio	i.p.	Intraperitoneal
MF	Mezcla Física		

## 1. ANTECEDENTES.

Este proyecto de investigación tiene como antecedente el trabajo titulado *“Evaluación de nanopartículas lipídicas sólidas de origen natural como promotoras de absorción de antiepilépticos a través de la barrera hematoencefálica”* desarrollado en el Laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán a cargo del Dr. David Quintanar Guerrero así como en el Laboratorio de Neurofarmacología de Productos Naturales del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz a cargo de la Dra. Eva Gonzales Trujano por la M. en C. Violeta Toledo Sierra.

En dicho trabajo se optimizó tanto el método de fabricación, como las concentraciones de los componentes de nanopartículas lipídicas sólidas de ácido esteárico y de manteca de cacao, además de evaluar la eficiencia de encapsulación y su capacidad de carga usando fenitoína como fármaco modelo. También se estudió la influencia del proceso de purificación y liofilización en la estabilidad física de las formulaciones optimizadas y la temperatura de enfriamiento después de la fabricación.

Esas formulaciones fueron administradas en ratones macho albinos suizos para evaluar su efecto ansiolítico por medio de los modelos de respuesta no condicionada actividad ambulatoria de campo abierto, tablero con orificios y laberinto elevado en cruz. En esos experimentos también se evaluó la influencia que tiene la vía de administración en la respuesta observada usándose la vía oral y la vía intraperitoneal.

De manera general, los resultados relevantes fueron los siguientes: la fenitoína presenta una mayor solubilidad en ácido esteárico que en manteca de cacao por lo tanto las nanopartículas de ácido esteárico tienen una mayor eficiencia de encapsulación y capacidad de carga; a mayor tiempo y velocidad de agitación, el tamaño de partícula e índice de polidispersión (IP) son menores; la temperatura de enfriamiento no influye en el tamaño de partícula final; la variación de tamaño e índice de polidispersión es menor cuando se purifican a menores tiempos de centrifugación así como cuando se liofilizan usando mayor concentración de manitol.

Con respecto a la evaluación del efecto ansiolítico, se observó que los animales pasaban mayor tiempo en el área central en el modelo de la actividad ambulatoria de campo abierto, exploraban una menor cantidad de huecos en el modelo del tablero con orificios y se mantenían más tiempo en los brazos abiertos del laberinto elevado en cruz indicando que la ansiedad se redujo considerablemente. Tal efecto fue observado en mayor proporción con las nanopartículas de ácido esteárico y utilizando la vía intraperitoneal.

Derivado de la relevancia de los hallazgos encontrados, y para dar continuidad a los resultados obtenidos en el trabajo antes mencionado, para este proyecto se replicó la formulación de nanopartículas lipídicas sólidas de ácido esteárico cargadas con fenitoína para su administración intraperitoneal en ratones y se evaluó el efecto anticonvulsivo por medio de electroencefalografía (EEG), una técnica fundamental y ampliamente usada en la investigación sobre epilepsia. La implementación de estudios electroencefalográficos nos permite correlacionar adecuadamente los cambios electrofisiológicos que ocurren a nivel neuronal con los distintos tipos de crisis epilépticas cuando estas se presentan.

## 2. MARCO TEÓRICO.

### 2.1. Generalidades sobre epilepsia.

#### 2.2.1. Antecedentes históricos.

Tratar el tema de la epilepsia es adentrarnos en una enfermedad que ha sido conocida desde hace cientos de años en la que la interpretación de los signos y síntomas observables, así como las implicaciones socioculturales que produce han sido tratados de explicar desde diferentes puntos de vista dependiendo del periodo histórico desde el cual sea abordada.

Los primeros registros acerca del conocimiento de la epilepsia datan de la época de Babilonia en el siglo XI a.C., en donde se creía que la enfermedad era un castigo divino de los dioses como consecuencia de la desobediencia a sus mandatos (Figueroa & Campbell, 2015) siendo hasta la aparición de la escuela hipocrática en la antigua Grecia donde se pensó que la epilepsia no era una enfermedad sagrada proponiendo causas no sobrenaturales. Hipócrates en su tratado *“sobre la enfermedad sagrada”* la definió como una enfermedad hereditaria causada por el desequilibrio entre los cuatro humores de un individuo: sangre, bilis negra, bilis amarilla y flema (Rocha, 2005). A pesar de las observaciones realizadas por Hipócrates, la percepción de las personas acerca de la enfermedad siguió siendo la misma, dominada por la idea religiosa en la que se creía que era la consecuencia de la posesión de algún demonio que necesitaba ser exorcizado (Korczyn et. al., 2015). Años después, en la época Romana, Galeno formuló la hipótesis de que éste mal se debía a la interrupción del flujo del *“pneuma psíquico”* entre corazón y cerebro proponiendo como tratamiento la realización de sangrías, ejercicio moderado y dietas especiales (Korczyn et. al., 2015; Rocha, 2005).

Durante el periodo de la Edad Media, las figuras eclesiásticas se encargaron de difundir una explicación demoniaca de la enfermedad tomando como referencia los escritos bíblicos considerándola contagiosa y adquirida por causas sobrenaturales. Este periodo de ocultismo la convirtió en una enfermedad muy temida y era frecuente la toma de medidas extremas tales



como castrar y expulsar a los hombres, quemar a las mujeres acusándolas de brujería, así como enterrar vivas a las embarazadas. (Figueroa & Campbell, 2015).

Posteriormente durante el Renacimiento, comenzaron a formularse las primeras hipótesis de que la epilepsia se trataba de desbalances a nivel cerebral y a pesar de que aún predominaba su concepción divina, ya comenzaba a ser estudiada desde un enfoque científico. Años más tarde Thomas Willis (Villanueva, 2011) pionero en investigaciones neuroanatómicas, ubicó el origen de la enfermedad en el cerebro. Ya en la época contemporánea, los trabajos de Gustav Fritsch y Eduard Hitzig (Hagner, 2012) propusieron que la epileptogénesis se relaciona con una excesiva excitación motora. Después, John Hughlings Jackson (Covo, 2006) llevó a cabo extensos estudios clínicos, así como patológicos sobre el diagnóstico de la epilepsia ratificando que el origen se sitúa a nivel cerebral. Las anteriores fueron las primeras contribuciones que marcaron un antes y un después en el estudio de dicha enfermedad (Hogan & English, 2012; Rocha, 2005).

### 2.1.2. Definición de epilepsia.

Crear una definición para la descripción de la epilepsia no ha sido una tarea fácil, por un lado, a causa del desconocimiento de su origen y, por el otro, por la variedad de signos y síntomas que están asociados. En años recientes, la Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE, por sus siglas en inglés) ha proporcionado una definición conceptual en la que la define como un trastorno cerebral caracterizado por una predisposición duradera a experimentar crisis epilépticas teniendo consecuencias neurobiológicas, cognoscitivas, psicológicas y sociales (Fisher, et. al., 2005). Así mismo, define como una crisis epiléptica a la aparición transitoria de signos y/o síntomas provocados por una actividad neuronal anómala excesiva o simultánea en el cerebro. Desde el punto de vista fisiológico la epilepsia es consecuencia de un desbalance entre los sistemas excitatorios e inhibitorios de ciertos neurotransmisores dando lugar a descargas eléctricas excesivas o descontroladas entre las neuronas.

### 2.1.3. Tipos de crisis.

Las crisis pueden ser clasificadas de manera general en dos categorías: crisis focales y crisis generalizadas:

- a) Las crisis focales se originan en una región específica en la que solo un grupo usualmente pequeño de neuronas experimentan una activación inicial.
- b) Las crisis generalizadas presentan amplia activación neuronal en extensas áreas de ambos hemisferios cerebrales.

A partir de esta clasificación general se pueden describir varios subtipos de crisis con distintas manifestaciones clínicas y que involucran regiones cerebrales particulares, por lo cual, un individuo puede experimentar múltiples crisis de varios tipos. De hecho, un evento de crisis única puede involucrar más de un tipo de crisis; es muy común que crisis focales evolucionen hacia crisis generalizadas en donde la activación neuronal pase de un solo punto focal hasta alcanzar otras áreas cerebrales (Berg et al., 2010).

#### 2.1.3.1. Crisis focales.

Las manifestaciones clínicas de una crisis focal son un reflejo de la región cerebral en la cual ocurre:

**Crisis sensorial.** Puede producir experiencias sensoriales extrañas como percibir olores desagradables o escuchar sonidos inexistentes lo que implica que la crisis se genera en la corteza sensorial.

**Crisis afásica/fonética.** Incapacidad repentina de hablar, escribir o leer. El foco de la crisis se encuentra ya sea en la corteza temporal, inferior frontal o inferior parietal.

**Crisis somato-sensoriales.** Causan parestesias a menudo referidas como sensaciones de frío o calor así, como sensación de hormigueo. El foco de la crisis se encuentra en la corteza somatosensorial.

**Crisis adversa.** Resulta en movimientos repentinos de cabeza y ojos hacia el hemisferio opuesto al foco de la crisis situado en la corteza frontal.

**Crisis motora focal.** Se caracteriza por espasmos clónicos de los músculos opuestos a la corteza motora donde se producen las descargas. Los músculos involucrados dependen de la zona afectada en dicha corteza pudiendo afectar incluso a la totalidad de ellos de solo la mitad del cuerpo. La actividad motora puede ser moderada o extrema.

**Crisis parcial compleja.** Se presenta pérdida de conciencia y puede surgir de cualquier área de la corteza con alto nivel de asociación reservada a funciones complejas tales como el habla, las emociones o la memoria. Estas crisis pueden producir gran variedad de efectos incluyendo alucinaciones visuales o auditivas, sentimientos de familiaridad o extrañeza.

#### 2.1.3.2. Crisis generalizadas.

A pesar de que las crisis focales se pueden propagar a crisis generalizadas, existen muchas circunstancias en las que la corteza entera puede presentar actividad epiléptica de forma repentina:

**Crisis tónica.** Se caracterizan por la extensión de las extremidades y rigidez general del cuerpo, así como pérdida de la función cognitiva.

**Crisis atónica.** Se produce una pérdida repentina del tono muscular a veces precedido por un tirón *mioclónico*. Estos ataques generalmente duran solo algunos segundos y no involucran la pérdida de la conciencia.

**Crisis clónica.** Se presentan espasmos musculares repetitivos que pueden durar hasta un minuto.

**Crisis mioclónica.** Contracciones musculares rápidas involuntarias. El término mioclónico implica un solo evento de espasmo mientras que el término clónico implica varios espasmos repetitivos.

**Crisis tónico-clónica.** Se caracteriza por la pérdida de conciencia inmediata además de secuencias ordenadas de actividad motora. Esta actividad comprende distintas fases tónicas (brazos semi-flexionados y piernas extendidas) seguidas por fases clónicas (espasmos de todo el cuerpo con periodos de relajación intermitente).

**Crisis de ausencia.** Breves lapsos de pérdida de conciencia de alrededor de 10 segundos o menos sin el componente tónico o clónico.

Es importante señalar que, en todos los tipos de crisis generalizadas, a excepción de las crisis de ausencia, el individuo que las experimenta corre un grave peligro de sufrir lesiones como consecuencia de la pérdida de la postura y la subsecuente caída que pone en riesgo su integridad.

#### 2.1.4. Principales causantes de epilepsia.

En algunos casos las causas atribuibles a la epilepsia pueden ser las lesiones cerebrales causadas por traumatismos craneoencefálicos graves, la presencia de tumores cerebrales, accidentes cerebrovasculares en los que el paso de oxígeno al cerebro se ve disminuido, daño cerebral causado por lesiones prenatales o perinatales, infecciones cerebrales como meningitis, encefalitis o neurocisticercosis, etc. Los factores hereditarios también juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad encontrándose hasta hace algún tiempo más de 50 genes humanos mutados que están relacionados con los síndromes epilépticos (Coorg et. al.,

2013). Sin embargo, en la mayoría de las veces no se encuentra una causa identificable aparente; en este caso se le llama epilepsia idiopática.

#### 2.1.5. Repercusiones emocionales y sociales.

El impacto que representan las enfermedades en las personas se encuentra influenciado por el contexto, histórico, médico, social, cultural y económico. Las creencias que predominan en la sociedad acerca del origen de la epilepsia han sido determinantes para marginar a los individuos que la padecen, desarrollando la idea de que sufren de una enfermedad vergonzosa con todas las represalias sociales que esto conlleva y que impacta finalmente en su calidad de vida optando incluso por no buscar tratamiento para evitar que se les identifique con la enfermedad. Tal estigmatización implica la modificación de las actividades normales del individuo tanto en el ámbito educativo, familiar y laboral (Figuroa, 2010). La discriminación social que rodea a la epilepsia en algunos lugares muchas veces es más difícil de vencer que las propias crisis; la legislación en algunos países es reflejo de lo anterior, por ejemplo, en China y la India la epilepsia es considerada frecuentemente como motivo para prohibir o anular el matrimonio, en el Reino Unido esta misma ley fue anulada hasta 1971 y en los Estados Unidos era muy común en esa misma época que a las personas que la padecían les fuera negada la entrada a restaurantes, teatros, centros recreativos y demás lugares públicos (OMS, 2019).

#### 2.2. Barrera hematoencefálica.

El sistema microvascular cerebral es una importante red que controla el transporte de sustancias de diversa naturaleza hacia el sistema nervioso central (SNC) provenientes desde la circulación sistémica, la cual, junto con todas las estructuras que lo conforman es lo que se conoce como barrera hematoencefálica (BHE). Si esta barrera no existiera, la microvasculatura cerebral podría proveer de una excelente vía de acceso hacia el cerebro aprovechando su gran área superficial de 20 m<sup>2</sup> y su longitud de 640 km. Este gran sistema le daría al cerebro la posibilidad de poder ser permeado por distintas moléculas mediante difusión pasiva en menos de un segundo (Pardridge, 2003). La BHE está diseñada para proteger al SNC de agentes

patógenos y tóxicos, pero así mismo restringe la entrada de diversos fármacos que son efectivos en el tratamiento de distintos trastornos neurológicos (Tosi et. al., 2016).

### 2.2.1. Características y estructura.

La BHE consiste en paredes formadas por capilares que aíslan las estructuras cerebrales del torrente sanguíneo, su baja permeabilidad se debe a su estructura anatómica caracterizada por uniones estrechas entre las células endoteliales que conforman tales capilares, la presencia de transportadores en su superficie y la baja actividad enzimática que en ésta ocurre por lo que son estructuralmente diferentes a cualquier otro capilar de otros tipos de tejidos. También se ha comprobado que existe una alta resistencia eléctrica trans-endotelial a lo largo de las uniones estrechas del orden de los  $1500-2000 \Omega\text{cm}^2$  nuevamente comparado con los  $3-30 \Omega\text{cm}^2$  que presentan otros capilares (Ribbeco et. al., 2018). Desde el punto de vista anatómico, la BHE está compuesta por cinco unidades estructurales: pericitos, astrocitos, neuronas, membrana basal y uniones estrechas (Luissint et. al., 2012). Dentro de estos, las zonas terminales de los astrocitos, la membrana basal y las uniones estrechas entre las células endoteliales son los constituyentes básicos (figura 1).

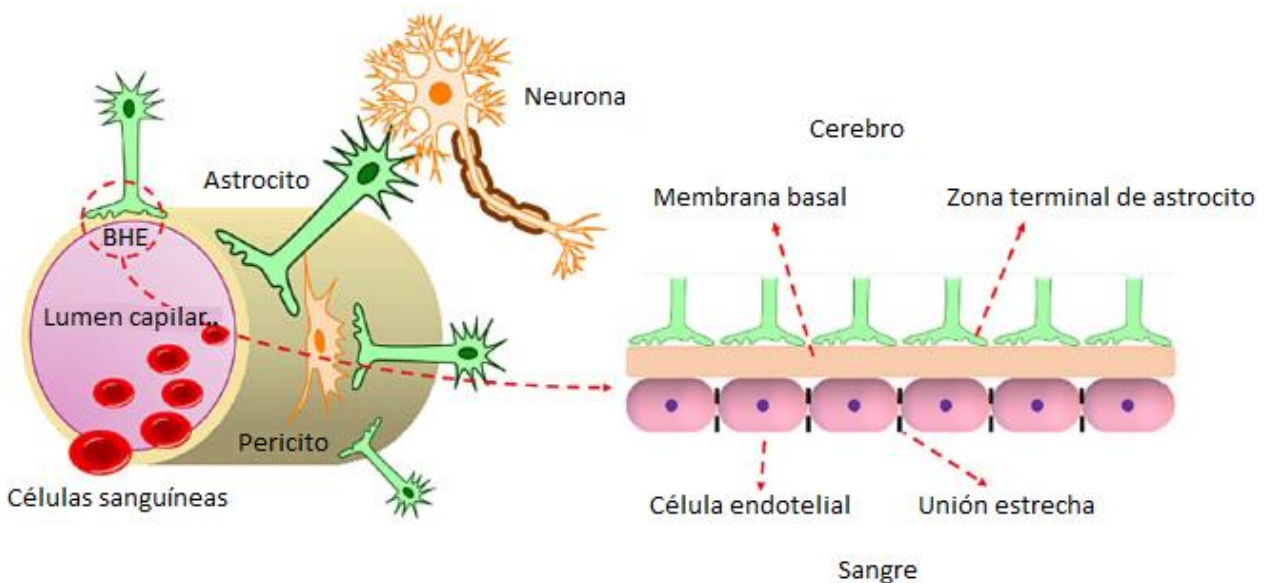


Figura 1. Representación esquemática de la barrera hemato-encefálica. Modificada de Zhou et al., 2018.

Los pericitos son los responsables del flujo sanguíneo en los capilares cerebrales a través de la contracción y relajación, los astrocitos son células gliales que conectan los capilares con las neuronas y se ha demostrado que éstos son esenciales para el mantenimiento de la integridad de la barrera (Eugenin et. a., 2011). La membrana basal comprende las células endoteliales y los pericitos y contiene proteoglicanos heparan sulfato, laminina, colágeno tipo IV y otras proteínas de matriz extracelular.

La compleja integración entre células endoteliales se debe a las uniones estrechas y a las uniones adherentes; estas células se juntan para unirse mediante la sección apical de la membrana plasmática de células adyacentes. Las uniones se crean por la interacción de varias proteínas transmembrana que se extienden y forman el citoplasma por una proteína asociada a la actina citoplasmática formando el enlace entre las células endoteliales. (Loch-Neckel & Koeppe, 2010).

### 2.2.2 Mecanismos de transporte de sustancias a través de la BHE.

En el pasado la BHE había sido considerada como una simple membrana estática impermeable a sustancias hidrofílicas y sólo permeable a sustancias lipofílicas, sin embargo, hoy en día se sabe que se trata de una interfase dinámica capaz de permitir el paso de sustancias de diversa naturaleza utilizando diferentes vías de acceso que pueden implicar o no un consumo energético. Solo ciertos tipos de moléculas pequeñas como las del agua, algunos gases y algunos compuestos liposolubles son capaces de atravesar fácilmente la BHE por un mecanismo de difusión pasiva transcelular mientras que, por otro lado, el transporte de moléculas relativamente grandes, hidrofílicas, con gran carga eléctrica y polaridad se lleva a cabo mediante transporte activo. Hablando de las moléculas que pueden ejercer un efecto terapéutico a nivel del SNC, además de las características estructurales y funcionales de la BHE que dificultan el paso de moléculas a través de ella, se encuentran las propiedades fisicoquímicas de cada fármaco. Las investigaciones actuales han demostrado que existen algunos requerimientos que se deben cumplir para que los activos farmacológicos sean capaces

de cruzar hacia el SNC entre los que destacan que sean altamente lipofílicos y con una masa molecular menor a 400 Da (Pardridge, 2001).

De acuerdo a Abbott y colaboradores (2006), el paso de sustancias a través de la BHE se lleva a cabo mediante 5 diferentes mecanismos, los cuales se esquematizan en la figura 2.

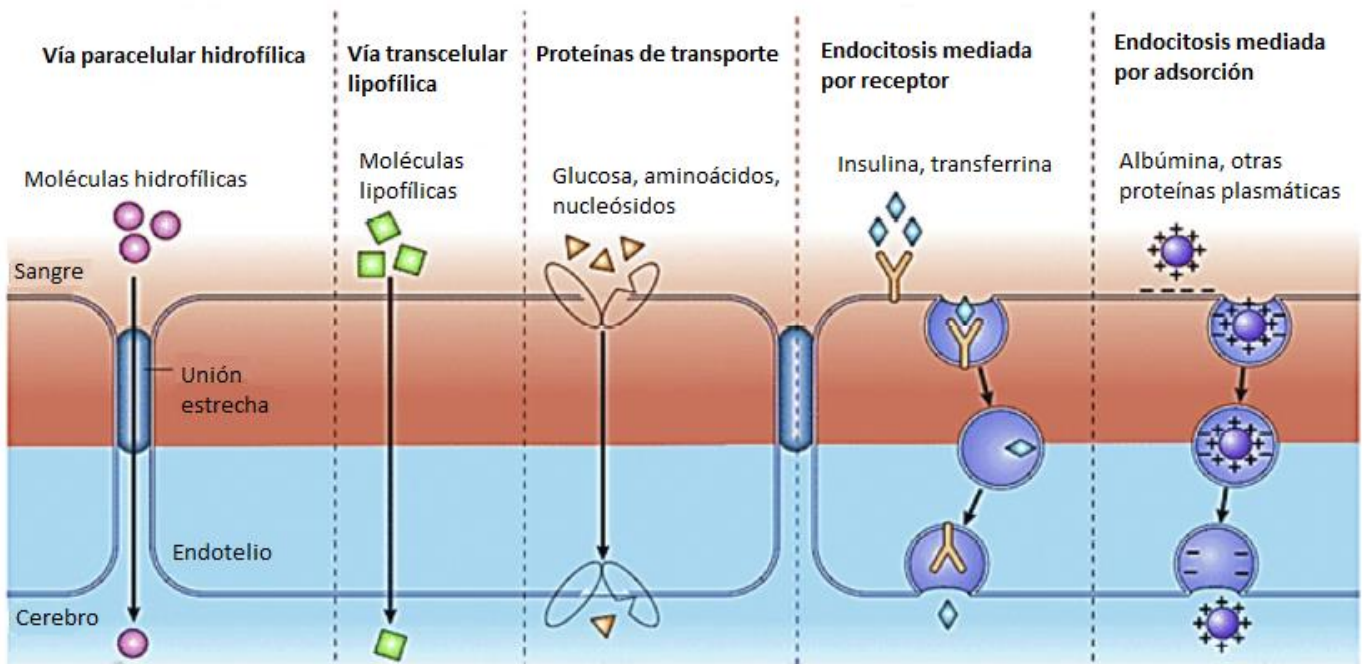


Figura 2. Mecanismos de transporte de sustancias a través de la barrera hemato-encefálica. Modificada de Abbott et al., 2006.

En primera instancia, las vías paracelular y transcelular pueden ser consideradas como mecanismos de transporte pasivo en los que no hay un gasto energético que cubrir mientras que las tres vías restantes se consideran mecanismos activos que implican el consumo de moléculas de ATP para que estos puedan ocurrir (Mikitsh & Chacko, 2014).

**Vía paracelular.** Es un proceso no saturable y no competitivo que se lleva a cabo entre células el cual se ve limitado por la presencia de las uniones estrechas entre las células endoteliales lo



que dificulta el proceso difusivo. Sólo moléculas hidrofílicas pequeñas son capaces de difundir a través de las uniones estrechas cruzando así la BHE (Stamatovic et al., 2008).

**Vía transcelular.** Toma lugar a través de las células siendo igualmente no saturable y no competitivo. Para este tipo de transporte, las moléculas deben tener alto grado de lipofilidad así como bajo peso molecular para poder atravesar la BHE (Sandoval & Witt, 2008).

**Proteínas transportadoras.** El intercambio de nutrientes entre sangre y cerebro se produce mediante sistemas de transportadores selectivos asociados a membranas. Cuando la sustancia es reconocida por su transportador específico, éste permite su acoplamiento para poder ser llevado hacia el interior. Han sido identificados diferentes sistemas de transportadores en los capilares cerebrales en los que su actividad es regulada por las necesidades metabólicas del cerebro y por la concentración plasmática de varios sustratos entre los que se encuentran glucosa, galactosa, aminoácidos, nucleósidos, lactatos, piruvatos, adenina, guanina, colina y vitaminas (Ricci et al., 2006).

**Endocitosis mediada por receptor.** Algunas proteínas endógenas y hormonas son capaces de cruzar la BHE por endocitosis mediada por receptores específicos; han sido identificados para insulina, factores de crecimiento, angiotensina II, folatos y transferrinas (Yoshikawa & Pardridge, 2001). Los lípidos pueden atravesar la barrera también por endocitosis en forma de lipoproteínas de baja densidad (LBD) las cuales son reconocidas gracias a la expresión de apolipoproteínas, como la ApoE, en la superficie de las LBD (Blasi et al., 2007).

**Endocitosis mediada por adsorción.** Algunas proteínas policatiónicas como albúminas e inmunoglobulinas pueden cruzar la BHE mediante endocitosis adsortiva sin que estén involucrados receptores membranales específicos. En este caso la endocitosis se lleva a cabo mediante la interacción de las cargas positivas de los policationes con las cargas negativas asociadas a la membrana plasmática de las células endoteliales (Smith & Gumbleton, 2006, Allamm et al., 2010).

En lo que respecta a sistemas nanoparticulados para la liberación de fármacos dentro del SNC, de manera general estos siguen las mismas vías de acceso que se acaban de describir (figura 3) exceptuando la vía paracelular (Zhou et al., 2018).

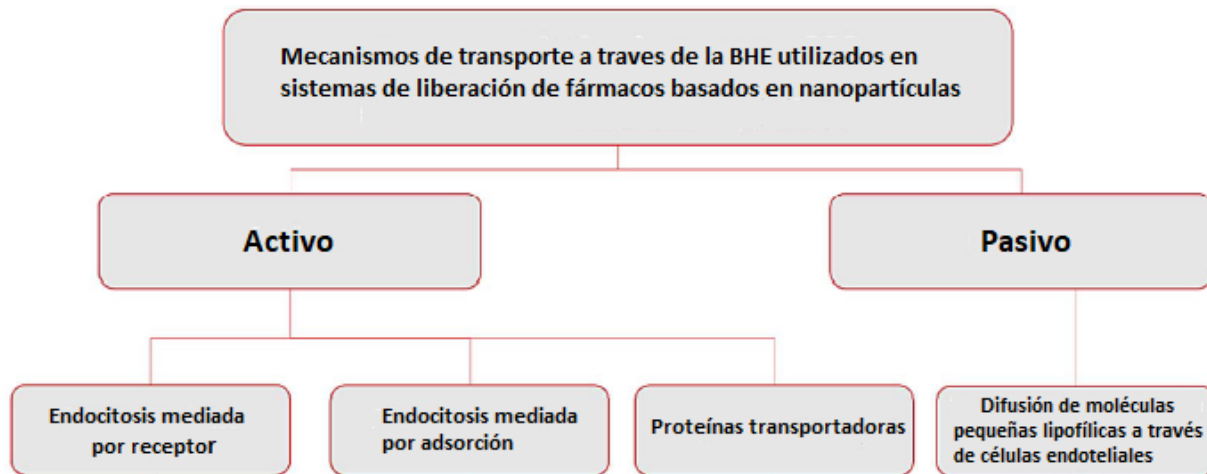


Figura 3. Clasificación de los mecanismos de transporte que siguen los sistemas nanoparticulados para cruzar la barrera hemato-encefálica. Modificado de Zhou et al., 2018.

### 2.3. Nanopartículas como acarreadores de fármacos.

Alcanzar ciertos tejidos y evadir los sistemas de protección propios de organismo en contra de la presencia de agentes extraños se puede lograr mediante el uso de sistemas coloidales diseñados para transportar y liberar fármacos. Dichos transportadores coloidales usualmente tienen tamaños de entre 1 a 1000 nm y consisten en agregados moleculares dentro de los cuales los agentes terapéuticos se encuentran adsorbidos, entrampados, o enlazados covalentemente. Las nanopartículas han resultado ser sistemas importantes para alcanzar tales propósitos en los que el potencial mecanismo para la liberación de fármacos depende de su composición, estructura y propiedades (Barbu et al., 2009).

En este punto también es importante mencionar que el principal factor que limita su efectividad es la rápida depuración de la circulación general que experimentan por la actividad

del sistema retículo-endotelial que depende entre otras cosas del tamaño de partícula y de la carga y propiedades superficiales (Moghini et al., 2001).

#### 2.3.1. Nanotransportadores lipídicos.

Nanotransportadores basados en lípidos han sido frecuentemente utilizados como sistemas de entrega de fármacos aprovechando las características distintivas de estos. Por ejemplo, siendo el mayor componente de la membrana celular y teniendo un rol importante en la formación de bicapas, los fosfolípidos, como una clase de moléculas lipídicas, han sido ampliamente estudiados en los últimos años (Campani et al., 2018), aprovechando su naturaleza anfifílica pudiendo incorporar tanto moléculas lipofílicas como hidrofílicas, baja toxicidad y biocompatibilidad. Además, como ya fue mencionado con anterioridad, estos sistemas son capaces de alcanzar la región cerebral mediante transportadores asociados a membrana como los receptores de lipoproteínas de baja densidad (Allam et al., 2010). Algunos ejemplos de nanotransportadores lipídicos son liposomas, micelas, nanoemulsiones tales como sistemas de liberación de fármacos nano-autoemulsificables (SNEDDS, por sus siglas en inglés), nanopartículas lipídicas sólidas y acarreadores lipídicos nanoestructurados (Mishra et al., 2018).

#### 2.4. Nanopartículas lipídicas sólidas.

Las nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) pueden definirse como nanoesferas de 50 a 1000 nm de diámetro formadas a partir de una matriz de lípidos sólidos a temperatura ambiente como por ejemplo glicéridos, triglicéridos, ácidos grasos, alcoholes grasos, ésteres o ceras, estabilizados por emulsificantes como poloxámeros, ésteres de sorbitan, alcohol polivinílico o éteres de polioxietileno (figura 4). Todos estos materiales son fisiológicamente compatibles además de ser generalmente reconocidos como seguros (certificación GRAS) por la FDA debido a su baja toxicidad (Battaglia & Gallarate, 2012).

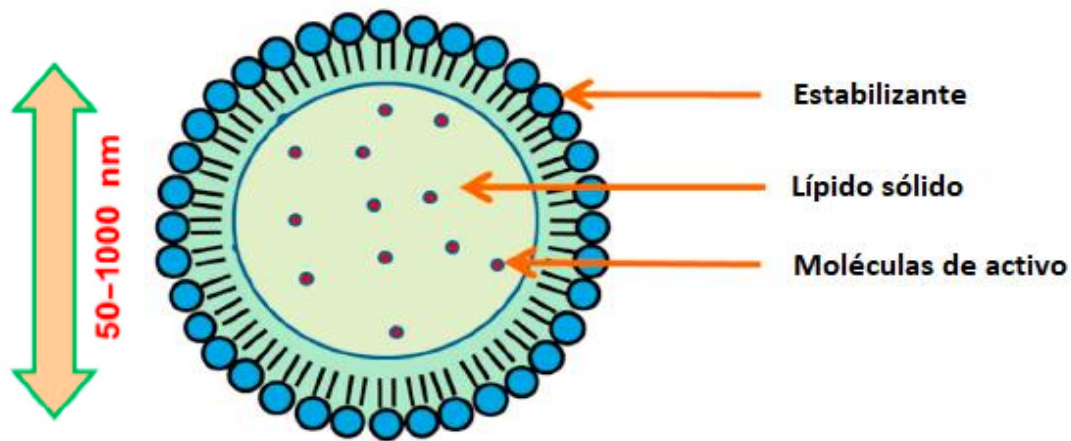


Figura 4. Representación esquemática de las nanopartículas lipídicas sólidas. Modificada de Bezerra et al., 2018.

Las NLS ofrecen mejoras significativas en cuanto a la liberación de fármacos atrapados en comparación con los sistemas de liberación tradicionales contribuyendo a minimizar los problemas relacionados con su baja solubilidad acuosa, protegiéndolos de sufrir procesos de degradación fisicoquímica, proporcionando una plataforma para su liberación controlada además de ser un eficiente transportador para ser direccionados a un objetivo biológico específico (Gastaldi et al., 2014).

En lo referente a su uso como transportadores para atravesar la BHE hacia el SNC presentan algunas ventajas como sistemas de liberación de fármacos; al ser fabricadas a base de compuestos lipídicos, exhiben buena biocompatibilidad; generalmente tienen buena capacidad de carga; se puede evitar el uso de disolventes orgánicos en su preparación; su fabricación puede ser fácilmente escalable industrialmente (Müller et al., 2000); se puede obtener la liberación controlada de los activos por varias semanas (Zur Mühlen et al., 1998), el potencial de direccionamiento a blancos específicos puede ser mejorado al incrustar ciertos tipos de moléculas en su superficie (Göppert & Müller, 2003); las formulaciones son muy estables por periodos prolongados de tiempo en comparación con otros sistemas coloidales (Freitas & Müller, 1998).

#### 2.4.1. Ácido esteárico.

El ácido esteárico o ácido octadecanoico (figura 5) es un ácido graso saturado ampliamente utilizado en formulaciones farmacéuticas, cosméticas y alimenticias (Monteyne et al., 2016). Se considera un ácido graso de cadena larga al tener 18 átomos de carbono en su estructura química y se encuentra presente en forma natural en carnes, pescados, cereales y lácteos (Basulto et al., 2009). Se encuentra en el listado de compuestos Generalmente Reconocidos Como Seguros de la FDA por lo que es no tóxico y biocompatible.

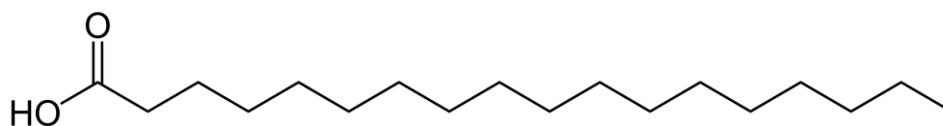


Figura 5. Estructura química del ácido esteárico.

#### 2.4.2. Métodos de fabricación de NLS.

Existen distintos métodos en que las NLS pueden ser preparadas con distintos requerimientos energéticos y parámetros críticos que deben ser tomados en consideración en la elección de alguno de ellos. A continuación, se enlistan los más representativos.

##### 2.4.2.1. Homogenización al alto corte.

En este proceso, los líquidos o dispersiones son forzadas a pasar a través de hendiduras que miden solo algunos micrómetros de espesor al ser sometidos a altas presiones (100-2000 bar). Las grandes fuerzas de corte y las fuerzas de cavitación son las responsables de la reducción del tamaño de partícula. Este proceso puede ser llevado a cabo en frío o en caliente y ha sido elegido en gran medida por la factibilidad de poder ser escalado fácilmente (Kathe et al., 2015).

#### 2.4.2.2. Homogenización en caliente.

En este caso, los lípidos son fundidos de 5 a 10 °C por arriba de su punto de fusión y las concentraciones típicas van desde 1-20 % (m/v), siendo esta fase donde el fármaco se adiciona. Por otro lado, la fase acuosa que contiene al estabilizante se calienta a la misma temperatura que los lípidos. La fase lipídica es emulsificada en la fase acuosa con agitación a altas velocidades.

#### 2.4.2.3. Homogenización en frío.

Esta técnica se emplea generalmente con fármacos sensibles a la temperatura. Primero se dispersa el fármaco en el lípido fundido para después ser sometidos a un rápido proceso de enfriamiento y molienda bajo nitrógeno líquido. Posteriormente, esta fase se dispersa en disolución de estabilizante y se homogeniza a alta presión a temperatura ambiente para conseguir la reducción del tamaño de partícula (Naseri et al., 2015).

#### 2.4.2.4. Emulsificación/Evaporación de disolvente.

Se basa en la precipitación de los lípidos en una emulsión o/w. Los lípidos junto con el fármaco se solubilizan en un disolvente orgánico inmiscible en agua para después ser emulsificados en la fase acuosa que contiene el estabilizante. El disolvente orgánico es desplazado bajo presión reducida favoreciendo la precipitación de las nanopartículas. El principal inconveniente de esta técnica es el uso de disolventes orgánicos que a pesar de que durante el proceso son eliminados, pueden quedar pequeñas trazas de estos (Negi et al., 2013).

#### 2.4.2.5. Microemulsión.

El método se basa en la dilución de microemulsiones conteniendo al lípido fundido, surfactante, co-surfactante y agua. La microemulsión caliente es dispersada en agua fría bajo agitación constante y el exceso de agua es eliminado por ultrafiltración para finalmente obtener un concentrado de nanopartículas (Kathe et al., 2015).

#### 2.4.2.6. Inyección de disolvente.

En esta técnica se precipitan los lípidos disueltos en un disolvente orgánico miscible en agua. De manera general, la disolución lipídica es inyectada rápidamente en la fase acuosa con el estabilizante con lo que se evita el uso de equipos de alta presión siendo una técnica que no requiere de instrumentación sofisticada para poder realizarse (Shah et al., 2011).

#### 2.4.2.7. Doble emulsión.

Este método es de una variante de la técnica emulsificación/evaporación de disolvente adaptada para fármacos hidrofílicos. El fármaco se solubiliza junto con el estabilizante en la fase acuosa para después ser emulsificado en la fase orgánica inmiscible en agua formando una emulsión w/o, después, la primera emulsión es dispersada en agua formando la doble emulsión w/o/w. Finalmente el disolvente es eliminado bajo presión reducida (Müller et al., 2011).

#### 2.4.2.8. Fluidos supercríticos.

La tecnología de fluidos supercríticos (FS) ha sido aplicada en el desarrollo de formulaciones farmacéuticas y alimenticias resaltando el método de Expansión Rápida de Disoluciones Supercríticas (RESS por sus siglas en inglés). De manera muy general, la fabricación de NLS por este método se puede resumir en dos pasos: primero, el lípido fundido y el activo son mezclados junto con el FS a ciertos valores de presión y temperatura y segundo, cuando la mezcla es atomizada se produce la expansión del FS conduciendo a la formación de las nanopartículas (Yang & Ciftci, 2016).

#### 2.4.3. Caracterización de NLS.

La caracterización de los sistemas coloidales desarrollados como nanotransportadores se ha convertido en un parámetro importante para lograr que cumplan con los objetivos para los que fueron diseñados ya que, dependiendo de sus características, éstos serán capaces de alcanzar su sitio de acción y liberar los activos de manera efectiva permaneciendo estables durante este proceso (Kupetz & Bunjes, 2014). Las técnicas más empleadas son las siguientes:

#### 2.4.3.1. Tamaño de partícula y potencial Z.

Dispersión de luz dinámica y difracción laser son los métodos más utilizados en el análisis del tamaño de partícula mientras que la microelectroforesis de laser Doppler mide adecuadamente la carga superficial. El fenómeno de dispersión de luz dinámica permite medir partículas desde un nanómetro hasta 3 micrómetros de diámetro mientras que el de difracción laser, permite medir partículas por arriba de 100 nanómetros hasta 3 milímetros y ambos se basan en la detección de los efectos de dispersión de luz los cuales son correlacionados con el tamaño de la partícula (Foerter-Barth & Teipel, 2000).

#### 2.4.3.2. Microscopía electrónica.

La evaluación de la morfología de las partículas, así como la textura de su superficie, se puede llevar a cabo mediante microscopía electrónica de barrido, así como por microscopía electrónica de transmisión, siendo además técnicas que permiten evidenciar la formación de las nanopartículas y en cierta medida su tamaño. Una técnica de más reciente desarrollo que las anteriores es la microscopía de fuerza atómica por medio de la cual es posible obtener con gran precisión y detalle un escaneo tridimensional de la superficie de la muestra por medio de una sonda o punta de tamaño submicrónico que recorre su superficie estando en contacto con ella o situándose muy cerca (Habibullah, 2020).

#### 2.4.3.3. Eficiencia de encapsulación o entrapamiento.

Es importante determinar la cantidad de fármaco que queda entrapado en las nanopartículas, es decir, la eficiencia de entrapamiento para entre otras cosas, saber a qué dosis serán administradas. La eficiencia de entrapamiento en gran medida queda definida por la cantidad de fármaco que el lípido es capaz de solubilizar. Por lo tanto, es necesario centrifugar las muestras para separar las nanopartículas del resto de los componentes y cuantificar el analito siendo la cromatografía de líquidos y la espectrofotometría los métodos más utilizados (Kupetz & Bunges, 2014).



#### 2.4.3.4. Forma polimórfica y grado de cristalinidad.

Uno de los métodos más empleados para tales fines es la calorimetría diferencial de barrido que nos permite comparar cambios en los puntos de fusión, así como temperaturas de transición vítreas de los diferentes componentes de la formulación con sus respectivos valores de entalpías asociados. Se ha comprobado que el grado de cristalinidad y la forma polimórfica pueden modificar la cinética de liberación y por lo tanto influir en la biodisponibilidad de los activos (Jog & Burgess, 2017).

#### 2.5. Fármacos anticonvulsivos.

A través de los años, diversas sustancias han sido utilizadas con el fin de combatir la epilepsia, incluso muchas de ellas fueron descubiertas por casualidad al tratar aliviar otras enfermedades cuando se administraron en pacientes epilépticos, ejemplo de lo anterior fue el uso del bromuro en 1857 y del fenobarbital en 1912 (Sills & Rogawski, 2020). Años después en 1936 las pruebas en animales llevaron al descubrimiento de la fenitoína y desde entonces se han encontrado más de 30 diferentes moléculas como resultado de las investigaciones basadas en este enfoque.

Los fármacos anticonvulsivos (FAC) son el tratamiento terapéutico de primera elección contra la epilepsia de la que alrededor del 60 % de los pacientes que la padecen logran controlar efectivamente las convulsiones que la caracterizan al prevenir que estas ocurran, por lo tanto, los FAC se definen como compuestos que son capaces de evitar la aparición de crisis convulsivas (Sills & Rogawski, 2020). Las personas epilépticas deben de estar sujetas a un régimen de administración crónica de anticonvulsivos ya que se ha demostrado que estos prácticamente tienen un efecto nulo sobre las bases celulares y moleculares que la originan siendo en la gran mayoría de los casos aún desconocidos. Lo anterior significa que no existe una cura para la enfermedad, en lugar de eso, lo que se busca es contrarrestar las manifestaciones clínicas que los pacientes experimentan (Wang & Chen, 2019).

### 2.5.1. Mecanismo de acción.

De manera general, los FAC fundamentalmente influyen sobre los mecanismos excitatorios e inhibitorios de los circuitos cerebrales al suprimir la hiperexcitabilidad anormal y la actividad hipsincrónica neuronal siendo estos los fenómenos responsables de las crisis convulsivas perdiéndose de esta forma el balance normal entre ellos (Rogawski & Loscher, 2004). Basado en el concepto anterior, los FAC actuales ya sea atenúan los mecanismos excitatorios o aumentan los inhibitorios (Bialer & White, 2010).

Generalmente, la excitabilidad neuronal se relaciona con dos factores, el primero es la capacidad intrínseca de activación de la neurona la cual es principalmente determinada por la variedad de canales iónicos dependientes de voltaje localizados en diferentes compartimentos de la membrana celular. Estos canales pueden disminuir el umbral de activación eléctrica por debajo de lo normal contribuyendo a la generación de las descargas propias de una crisis. Mutaciones en los genes relacionados a estos canales, incluyendo los de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{K}^+$ , están ampliamente relacionadas con la fisiopatología de las crisis epilépticas (Oyler et al., 2018). El segundo factor es la entrada extrínseca de señales neuronales determinada por la transmisión sináptica excitatoria e inhibitoria. La activación neuronal pre-sináptica contribuye a la liberación de neurotransmisores y juega un papel importante en el comportamiento de la activación neuronal post-sináptica conduciendo a la propagación de descargas epilépticas tanto en regiones cercanas como distantes. Basado en lo anterior, es posible clasificar el mecanismo de acción de los FAC actualmente disponibles en inhibidores de la excitación sináptica, moduladores de canales iónicos dependientes de voltaje y potenciadores de la inhibición sináptica (figura 6).

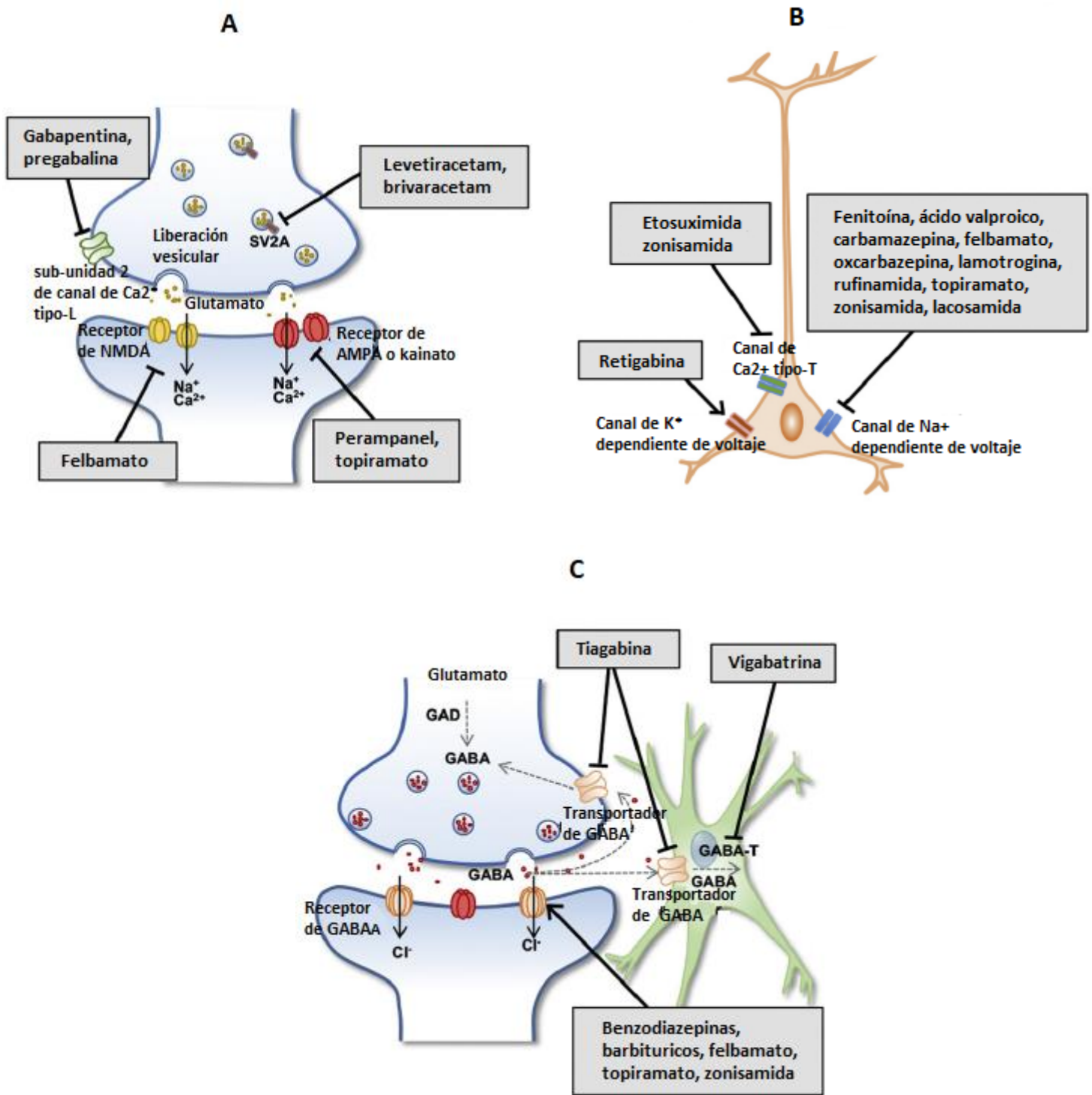


Figura 6. Principales mecanismos de acción de los fármacos anticonvulsivos. (A) Inhibidores de la excitación sináptica. (B) Moduladores de canales iónicos dependientes de voltaje. (C) Potenciadores de la inhibición sináptica. Modificada de Wang & Chen, 2019.

#### 2.5.1.1. Inhibición de la excitación sináptica.

El principal neurotransmisor excitatorio en el SNC es el glutamato que al momento de ser liberado en las terminales neuronales pre-sinápticas puede unirse a tres subtipos de receptores ionotrópicos específicos para glutamato e inducir un rápido efecto excitatorio los cuales son ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), kainato y N-metil-D-aspartato (NMDA). Estos receptores están localizados en las membranas neuronales post-sinápticas y funcionan como mediadores de la neurotransmisión excitatoria. De manera general, los FAC que son capaces de inhibir la excitación sináptica actúan sobre alguno de estos tres receptores. Algunos ejemplos son los siguientes: perampanel, un antagonista selectivo no competitivo, se acopla a los receptores AMPA (French et al., 2012), topiramato ejerce su efecto anticonvulsivo vía receptores AMPA y kainato (Gryder & Rogawski, 2003) y felbamato que actúa sobre los receptores NMDA (Rho et al., 1994).

#### 2.5.1.2. Modulación de canales iónicos dependientes de voltaje.

Los canales iónicos de sodio dependientes de voltaje juegan un papel importante en la iniciación y propagación de los potenciales de acción en las neuronas (Mantegazza et al., 2010). Los bloqueadores de sodio son el tipo de FAC más empleado para el tratamiento de la epilepsia. Fármacos como la fenitoína, carbamacepina y el valproato se unen a los canales que se encuentran en estado activo y reducen los potenciales de acción de alta frecuencia durante la crisis, algunos otros como la oxcarbazepina, lamotrigina y zonisamida actúan facilitando la inactivación rápida de los canales.

En cuanto a los canales iónicos de potasio dependientes de voltaje se ha observado que limitan la excitabilidad neuronal por medio de un mecanismo particular. La apertura de los canales conduce al potencial de membrana hacia la hiperpolarización con lo cual causa una reducción generalizada en la excitabilidad (Kohling & Wolfart, 2016). La retigabina actúa sobre ciertas subunidades de los canales de potasio las cuales influyen la corriente de potasio tipo M que a su vez tiene una estrecha relación con la aparición de las crisis (Schenzer et al., 2005), aunque cabe señalar que esta fue retirada del mercado en el año 2017 por causar alteraciones indeseadas en piel y visión (Hackethal, 2017).

Por último, los canales de calcio dependientes de voltaje, especialmente los de tipo-T, regulan la excitación neuronal de activación rápida característica especialmente en las crisis de ausencia. El fármaco que actúa sobre estos canales que ha sido mayormente estudiado y que mejor efecto tiene sobre tales crisis es la etosuximida (Coulter et al., 1989).

#### 2.5.1.3. Potenciación de la inhibición sináptica.

Uno de los principales y más importantes neurotransmisores inhibitorios en el SNC es el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y la potenciación de la neurotransmisión inhibitoria mediada por su efecto es un mecanismo clave en la actividad de los FAC. Se ha demostrado que cuando existen ciertas alteraciones en alguna de las etapas del llamado ciclo GABAérgico, estas guardan amplia relación con la aparición de crisis convulsivas (Loup et al., 2000). De manera general, el ciclo GABAérgico puede resumirse de la siguiente manera: GABA se sintetiza a partir de glutamato por la enzima glutamato descarboxilasa y después se libera para reducir la excitabilidad neuronal uniéndose a los receptores ionotrópicos GABA<sub>A</sub> y a los receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G GABA<sub>B</sub>, ambos localizados tanto en las neuronas pre-sinápticas como en las post-sinápticas. Después, GABA puede unirse a proteínas transportadoras altamente selectivas al neurotransmisor para después ser metabolizado por la enzima GABA transaminasa concluyendo de esta manera el ciclo de transmisión GABAérgica.

Actualmente, muchos de los FAC disponibles impulsan rápidamente la inhibición de la actividad excitatoria mediada por receptores GABA<sub>A</sub> acoplándose directamente con los estos receptores. Como el receptor también se encuentra asociado a canales iónicos, estos pueden modificar tanto el tiempo como la frecuencia de apertura del canal como en el caso de la acción de los barbitúricos y las benzodiazepinas (Bai et al., 2001). Algunos otros fármacos actúan modificando la actividad de las enzimas que se encargan del transporte o metabolismo de GABA para producir el efecto anticonvulsivo como lo hacen la tiagabina y la vigabatrina.

### 2.5.2. Fenitoína.

La 5,5-difenilhidantoína-2,4-diona o fenitoína (PHT) (figura 7) es un fármaco anticonvulsivo que ha estado bajo investigación clínica por alrededor de ocho décadas (Patocka et al., 2020) utilizado ampliamente para el tratamiento de crisis clónicas, así como tónico-clónicas. Posee un gran efecto inhibitorio selectivo hacia la corteza motora teniendo su sitio de acción en los canales de sodio dependientes del voltaje, aunque también se piensa que tiene cierto efecto estabilizador sobre las membranas neuronales incrementando los niveles de GABA (Keppel & Kopsky, 2017). Es a través de este mecanismo que ejerce su efecto anticonvulsivo, evitando el esparcimiento de las descargas anormales entre las neuronas de la corteza cerebral. Químicamente pertenece al grupo de las hidantoínas con un valor de pka de 8.33, un coeficiente de partición octanol/agua de 2.47 y un bajo valor de solubilidad acuosa de 32 mg/L perteneciente al grupo II del sistema de clasificación biofarmacéutica (baja solubilidad, alta permeabilidad).

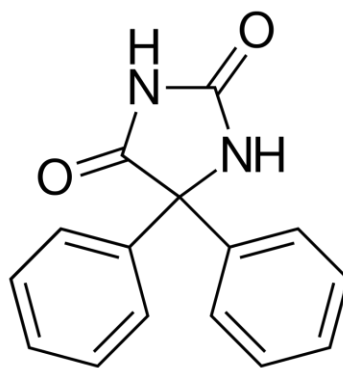


Figura 7. Estructura química del fármaco anticonvulsivo fenitoína.

## 2.6. Modelos animales usados en investigación sobre epilepsia.

Para facilitar el estudio de la epilepsia de la forma más completa posible, desde las causas hasta las consecuencias, se han desarrollado modelos experimentales que se basan principalmente en replicar las crisis epilépticas observadas en los humanos. Para que un modelo experimental sea válido, reproducible y se asemeje al proceso que se desea investigar debe cumplir con ciertas condiciones. Estos criterios de validez pueden resumirse de la siguiente manera (van der Staay et al., 2009):

- a) **Validez de constructo.** Es el grado de similitud entre el mecanismo por el cual se desarrolla el modelo experimental y el mecanismo por el cual se desarrolla en hecho investigado.
- b) **Validez aparente.** Es el grado de similitud descriptiva entre el modelo experimental y el hecho real que se desea emular. Una forma adecuada de identificar nuevos modelos experimentales mediante la validez aparente es comparando los síntomas presentados en el hecho que se desea investigar.
- c) **Validez de predicción.** Es la medida en la que se puede extrapolar un resultado medido mediante un modelo experimental, en un hecho real investigado. En psicofarmacología, esta validez se refiere a la capacidad de un modelo experimental para identificar adecuadamente la eficacia terapéutica de ciertos fármacos.

En el caso de modelos experimentales que emulen crisis epilépticas se deben cumplir los siguientes criterios (Sarkisian, 2001):

- a) El modelo animal debe mostrar correlaciones o patrones electrofisiológicos similares a los observados en la condición humana.

- b) Las etiologías deben ser similares, es decir, las condiciones humanas derivadas de una predisposición genética subyacente, lesión, trastornos de migración neuronal, etc., deben de presentarse en los modelos experimentales.
- c) Si la condición humana se caracteriza por la aparición del trastorno en una cierta edad, el modelo animal debe reflejar una edad similar.
- d) Si la condición humana se caracteriza por cambios patológicos específicos como lesiones focales o displasia cortical, el modelo experimental debe de presentar patologías similares.
- e) La condición que se está modelando debe de responder a los fármacos anticonvulsivos y tratamientos existentes para la correlación en humanos.
- f) Las características de comportamiento, incluidas sus manifestaciones inducidas por las convulsiones a corto y largo plazo deben ser similares a las exhibidas en los seres humanos.

#### 2.6.1. Clasificación.

De manera general, existen 3 formas en que pueden ser clasificados los modelos experimentales para epilepsia. La primera es considerando la duración del protocolo, es decir, el tiempo necesario para inducir las crisis y se divide en agudos y crónicos. La segunda es considerando la causa de la actividad epiléptica pudiendo ser por el uso de sustancias químicas, aplicando estímulos físicos o induciendo alteraciones metabólicas o mutaciones genéticas. La última clasificación es por el tipo de la actividad epiléptica que se genera; focal o generalizada, cortical o límbica, clónica o tónica, etc., (Zavala & López, 2011). Es importante mencionar que en la mayoría de los casos la categorización de los modelos resulta ser una combinación de las clasificaciones antes mencionadas (tabla 1).



Tabla 1. Modelos experimentales de epilepsia. Modificado de Zavala & López, 2011.

Tipo agente pro-epiléptico	Agente causante	Tipo de actividad epiléptica generada	Tipo de protocolo (duración)	Edad de los roedores
Químico	Ácido kaínico	Crisis parciales complejas secundariamente generalizadas, estatus epilépticos	Agudo Crónico	Adultos y en desarrollo
	Pilocarpina	Crisis parciales complejas secundariamente generalizadas, estatus epilépticos	Agudo Crónico	Adultos y en desarrollo
	Pentilentetrazol	Crisis tónico-clónicas generalizadas	Agudo	Adultos y en desarrollo
		Crisis parciales complejas secundariamente generalizadas	Crónico ( <i>kindling</i> químico)	Adultos
		Crisis de ausencia	Agudo	Adultos
	Glutamato monosódico	Crisis tónico-clónicas generalizadas	Agudo Crónico	En desarrollo
	Fluoroetil	Crisis tónico-clónicas generalizadas	Agudo	En desarrollo
	Toxina tetánica	Crisis secundariamente generalizadas	Crónico	Adultos y en desarrollo
Físico	<i>Kindling</i> eléctrico	Crisis parciales complejas secundariamente generalizadas	Crónico	Adultos y en desarrollo
	Generación de postdescargas corticales	Crisis parciales complejas o crisis mioclónicas	Agudo	En desarrollo
	Electrochoques	Crisis mioclónicas Crisis tónico-clónicas	Agudo	Adultos y en desarrollo
	Hipertemia	Crisis parciales complejas secundariamente generalizadas	Agudo Crónico	En desarrollo
	Hipoxia	Crisis tónico-clónicas	Agudo	En desarrollo
Genético	Ratas genéticamente propensas a crisis de ausencia GAERS	Crisis de ausencia	Descargas electrográficas tipo espiga de ondas espontáneas	Jóvenes (1 mes de edad) y adultas
	Ratas genéticamente propensas a crisis de ausencia WAG/Rij			
	Ratas genéticamente propensas a epilepsia GEPR	Crisis convulsivas primaria o secundariamente generalizadas	Sonido	Adultos

En los modelos agudos, las crisis epilépticas se inducen solo una vez y de manera rápida en un animal normal por lo regular en una sola sesión utilizando ya sea medios físicos o químicos. Este tipo de modelos son bastante útiles para estudiar los mecanismos de inducción y detención de la actividad epiléptica, así como las alteraciones surgidas una vez finalizada la crisis. Por otro lado, los modelos crónicos requieren de una manipulación repetida que permita la generación de crisis espontáneas o actividad epiléptica persistente (Fisher, 1989). Estos modelos facilitan el estudio de los procesos de epileptogénesis así como las consecuencias observadas entre una crisis y otra y cuando estas terminan en el sujeto que las padece.

Los modelos químicos, como dice su nombre, consisten en la inducción de actividad epiléptica como resultado de la administración de sustancias químicas que producen un efecto excitatorio, generalmente análogos glutamatérgicos, o sustancias que disminuyen o bloquean la neurotransmisión inhibitoria, por lo regular antagonistas GABAérgicos. También es posible generar las crisis epilépticas mediante la aplicación de estímulos físicos en los que se modifica la fisiología celular ya sea por medio de la inducción de corriente eléctrica, generando un aumento de la temperatura corporal (hipertemia) o disminuyendo la disponibilidad de oxígeno (hipoxia). De esta manera, y a diferencia de los modelos químicos, no se administra ninguna sustancia para estimular la actividad epiléptica, sino que se modifica el microambiente cerebral para obtener dicho efecto.

Los modelos genéticos de epilepsia incluyen distintas especies animales (ratón, rata, perro o mandril) que presentan actividad epiléptica espontánea o que exhiban un umbral bajo a las crisis generadas por distintos métodos (físicos o químicos) o que experimenten crisis epilépticas inducidas por estímulos sensoriales como la luz o el sonido (Grone & Baraban, 2015). En el caso de la rata, existen dos cepas que presentan descargas espiga-onda similares a las observadas en las crisis de ausencia las cuales son las Ratas Genéticamente Propensas a Crisis de Ausencia de Estrasburgo o GAERS, (siglas para *Genetic Absence Epilepsy Rat from Strasbourg*) y las Ratas Wistar Albino Glaxo o WAG/Rij (siglas para *Wistar Albino Glaxo Rat from Rijswijk*). Adicionalmente, existe otra cepa de ratas denominada Ratas Genéticamente Propensas a la

Epilepsia o GEPR (siglas para *Genetically Epilepsy-Prone Rats*) que presentan crisis clónicas o tónico-clónicas inducidas por sonidos o hipertemia.

### 2.6.2. Pentilentetrazol.

El fármaco convulsivante pentilentetrazol (PTZ) (figura 8) es un antagonista no competitivo de los receptores GABA<sub>A</sub> con los que interacciona mediante el sitio de unión a la picrotoxina bloqueando el canal de calcio (Ramos et al., 2012). Las manifestaciones conductuales causadas por el efecto del PTZ lo convierten en un modelo de crisis generalizadas en el que si es administrado a dosis bajas (20-30 mg/kg) se producen crisis de ausencia y a dosis altas (>50 mg/kg) se producen crisis clónicas o tónico-clónicas.

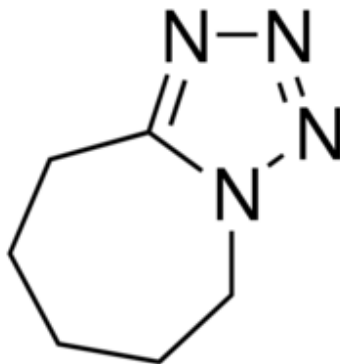


Figura 8. Estructura química del fármaco convulsivante pentilentetrazol.

### 2.7. Generalidades sobre electroencefalografía.

Una herramienta que ha resultado muy útil para el diagnóstico de la epilepsia ha sido el desarrollo de la electroencefalografía. Un electroencefalograma (EEG) es el registro de los cambios temporales de los potenciales eléctricos generados por la actividad neuronal que puede ser medido en distintas áreas cerebrales, es decir, la señal que se registra en el EEG es el voltaje que cambia constantemente en amplitud, frecuencia y fase (Biasiucci et al., 2019).

El biólogo inglés Richard Caton en el año de 1875 fue el primero en reportar la existencia de pequeñas fluctuaciones espontáneas en los potenciales eléctricos sobre la superficie cortical de un conejo indicando que los cambios en el voltaje que ocurrieron en el cerebro variaron según el lugar de registro y según el estímulo periférico específico aplicado observando además que los potenciales eran afectados por anoxia y desaparecían con la muerte del animal. Sin embargo, la era del EEG comenzó con el psiquiatra alemán Hans Berger quien en 1929 demostró que era posible registrar los ritmos cerebrales a través del cráneo y publicó la primera descripción del EEG en humanos. Reportó la presencia del ritmo alfa con frecuencia de 10 Hz y encontró que este desaparecía al abrir los ojos y con esfuerzo mental, por ejemplo, haciendo aritmética mentalmente, además que se bloqueaba con estímulos dolorosos y con ruido fuerte. También obtuvo registros en sueño y describió las descargas epilépticas (Marosi, 2012).

#### 2.7.1. Principios de funcionamiento.

El éxito de un registro de EEG depende en gran medida de la preparación de la zona craneal y de la colocación de los electrodos. En principio, cualquier metal que hace contacto con la corteza cerebral puede funcionar como un electrodo, sin embargo, los que son fabricados a base de acero inoxidable, son los más usados y confiables.

La señal del EEG que es transmitida por los electrodos es muy pequeña (entre 10 y 200  $\mu\text{V}$ ) por lo que debe ser amplificada. Los amplificadores utilizados tienen dos entradas y una salida y muestran la diferencia de voltaje entre dos puntos. Si dos áreas cerebrales conectadas bajo los dos electrodos de un canal tienen una actividad parecida, el registro en el canal de salida será muy bajo ya que la diferencia en la actividad captada entre estas dos áreas será mínima. Lo anterior significa que en el EEG no se ve la actividad real del área de la corteza bajo un electrodo, en lugar de esto, se observa la diferencia de actividades de dos áreas multineuronales subyacentes a los dos electrodos.

La señal es amplificada selectivamente, es decir, se conservan ciertas porciones definidas de esta y las demás se filtran. Lo anterior es importante ya que las señales no deseadas pueden contaminar el trazo de interés conociéndose este fenómeno como artefactos. Los artefactos son señales que aparecen en el EEG pero no tienen su origen en el cerebro sino en potenciales musculares o del corazón por lo que es de suma importancia la diferenciación entre las señales cerebrales y las que no lo son.

### 2.7.2. Frecuencias y ritmos cerebrales.

Como ya se ha mencionado, la actividad eléctrica se registra en la superficie de la corteza cerebral como cambios constantes en el voltaje durante un lapso de tiempo, por lo tanto, el rasgo más característico del EEG es la frecuencia de sus ondas. Las frecuencias registradas en la superficie de la corteza suelen abarcar desde 1 a 30 Hz y a su vez, estas se pueden dividir en distintos ritmos cerebrales a los cuales se les han atribuido distintos estados fisiológicos (Lopes da Silva, 2013).

**Ritmo delta.** De 0.5 a 3.5 Hz.

Las ondas delta pueden aparecer en cualquier parte de la cabeza y en personas sanas se relacionan con fases lentas del sueño teniendo tanto amplitud como de forma variable.

**Ritmo theta.** De 3.5 a 7.5 Hz.

Es el ritmo normal de los niños pequeños y del sueño lento. El ritmo theta de bajo voltaje puede aparecer en el EEG sobre los lóbulos temporales según la edad y el estado de alerta del sujeto. Suele estar relacionado con experiencias de meditación, procesamiento de tareas o con emociones negativas como la frustración.

**Ritmo alfa.** De 7.5 a 13 Hz.

Recibió esta denominación ya que fue la frecuencia que primero describió Berger. Se define no solo por su frecuencia, sino también por su amplitud, su distribución espacial y por su

comportamiento. Aparece con mayor amplitud en las regiones posteriores, aunque se pueden encontrar con individuos con ritmo alfa en casi toda la cabeza.

**Ritmo beta.** De 13-30 Hz.

El ritmo beta reside preferentemente en la región frontal pudiendo también ser posterior o localizado. Es el ritmo de vigilia atenta (alerta) y se relaciona con activación cognoscitiva o emocional. Se considera que es el ritmo que ocupa el lugar del alfa cuando el sujeto abre los ojos.

### 2.7.3. Morfología de las ondas.

Otro elemento importante para la interpretación del registro electroencefalográfico es la forma de sus ondas. Cuando existe un cambio brusco en la amplitud o frecuencia del trazado, se le llama paroxismo. Los paroxismos más frecuentes que aparecen en los EEG anormales son los siguientes (Marosi, 2012):

**Espigas.** Son descargas breves, con voltaje variable y corresponden a una irritación cortical fuerte generalmente relacionada a focos epilépticos.

**Poliespigas.** Es una sucesión más o menos prologada de espigas agrupadas. Aparecen durante la fase tónica de crisis tónico-clónica.

**Complejo espiga-onda lenta.** Se trata de la aparición de una espiga y seguida de manera inmediata de una onda lenta. Su forma puede variar, pero siempre señala actividad anormal epileptogénica de tipo complejo.

**Ondas agudas.** Tienen cierto parecido a las espigas, pero son de mayor duración. Se relacionan con focos epilépticos.

**Brotos de ondas lentas.** Son ondas delta hipsincrónicas y de voltaje elevado.

### 3. JUSTIFICACIÓN.

La epilepsia, como ha ocurrido con muchas otras enfermedades descritas en la historia de la humanidad, ha sido una de las más estigmatizadas e incomprendidas por el hombre teniendo consecuencias no solo a nivel físico sino también a nivel emocional en los individuos que la padecen (Figuroa & Campbell, 2004). Se estima que alrededor del mundo más de 50 millones de personas la padecen, lo que la convierte en uno de los trastornos neurológicos más comunes (Kawan et al., 2010).

En México, datos estimados de la prevalencia de esta enfermedad indican que existen de 10 a 20 casos por cada 1000 habitantes lo que implica que del 1 al 2 % de la población mexicana total la padecen, es decir de 1 300 000 a 2 600 000 personas (Valdés et al., 2019).

De aquí la importancia de realizar mayor investigación en el desarrollo de nuevos sistemas terapéuticos que permitan mejorar los resultados obtenidos con los tratamientos actualmente existentes, en los que generalmente se utilizan formas farmacéuticas convencionales. Dentro de esta categoría, los nanotrasportadores de tipo lipídico han demostrado tener una serie de ventajas tanto desde el punto de vista tecnológico brindando soporte y estabilidad a las moléculas de activo incorporado (Soares et al., 2013), como del biológico siendo biocompatibles (Silva et al., 2011) así como biodegradables (Yu et al., 2012).

Aunado a lo anterior, la fenitoína (PHT) ha sido utilizada como uno de los fármacos de primera elección en el tratamiento de las crisis convulsivas. No obstante, presenta una serie de limitaciones que condicionan su efectividad como lo son baja solubilidad acuosa y alto porcentaje de unión a proteínas plasmáticas (Treiman & Woodbury, 1995) lo que convierte en un excelente candidato a poder ser formulado en un nanotrasportador lipídico con todas las ventajas que estos ofrecen.

#### 4. HIPÓTESIS.

Al administrar Fenitoína en forma de Nanopartículas Lipídicas Sólidas en un modelo “in vivo” se podrá mejorar el efecto anticonvulsivo obtenido comparado con la administración de Fenitoína en un sistema de liberación tradicional lo que pondría en evidencia su utilidad como nanotransportadores que hacen más eficiente el paso de fármacos a través de la barrera hematoencefálica.



## 5. OBJETIVOS.

### 5.1. Objetivo general.

Evaluar el efecto anticonvulsivo de nanopartículas lipídicas sólidas de ácido esteárico sobre crisis epilépticas inducidas en ratones mediante el análisis de la actividad eléctrica cerebral por electroencefalografía para demostrar su eficacia como nanotransportadores.

### 5.2. Objetivos particulares.

- a) Practicar la cirugía estereotáxica utilizando ratones como modelo biológico para la implantación de los electrodos de registro usados en electroencefalografía.
- b) Estudiar las señales observadas en la actividad electroencefalográfica en los animales de experimentación analizando sus características para establecer las diferencias entre éstas en estado basal, cuando se administran las nanopartículas y cuando se inducen las crisis convulsivas.
- c) Analizar las diferencias que existen en cuanto a la latencia y duración de las crisis administrando los diferentes tratamientos para poder caracterizar su efecto.
- d) Determinar si las nanopartículas ejercen algún cambio en la tasa de mortalidad de los animales de experimentación analizando la incidencia del evento para establecer si existe asociación entre su administración y la presencia del mismo.

## 6. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

### 6.1. Reactivos.

- a) Ácido esteárico USP (Droguería Cosmopólita, México)
- b) Alcohol Polivinílico (Mowiol® 4-88, PM ~ 31 000, Sigma-Aldrich, E.U.A.)
- c) Agua ultrapura Tipo I (Simplicity® Merck Millipore, E.U.A.)
- d) Fenitoína (Sigma-Aldrich, E.U.A.)
- e) Agua HPLC (Fermont, México)
- f) Metanol HPLC (Fermont, México)
- g) Alcohol etílico absoluto (HYCEL Reactivos Químicos, México)
- h) Cloruro de Benzalconio (Farmacéuticos Altamirano, México)
- i) Clorhidrato de Xilazina (PiSA Agropecuaria, México)
- j) Ketamina (PiSA Agropecuaria, México)
- k) Solución Salina 0.9 % (PiSA, México)
- l) Polvo acrílico dental autocurable Nic Tone® (MDC Dental, México)
- m) Pentilentetrazol (Sigma-Aldrich, E.U.A.)

### 6.2. Equipos e instrumentos.

- a) Balanza Analítica (Boeco BBC 32, Alemania)
- b) Parrilla eléctrica con agitación magnética (Thermo Scientific, E.U.A.)
- c) Agitador de alta velocidad Ultra-Turrax® T-18 Basic (IKA, Alemania)
- d) Nanosizer (N4 Plus, Coulter Corporation, E.U.A.)
- e) Zetasizer Nano ZS (ZEN3600, Malvern Instruments Limited, Reino Unido)
- f) Ultracentrífuga (Optima™ LE-80K, Beckman, E.U.A.)
- g) Sistema de Liofilización de sobremesa (Labconco, E.U.A.)
- h) Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (Varian ProStar, E.U.A.)
- i) Aparato estereotáxico (Stoelting Co. E.U.A.)
- j) Micromotor (Foredom 21b, E.U.A.)
- k) Estación para soldar (Weller EC1002, Alemania)
- l) Polígrafo 78E con amplificadores 7PK511 (GRASS Instruments Co. E.U.A.)
- m) Sistema de adquisición ADQCH8: Convertidor de señal analógica-digital y software de registro de señales digitales (desarrollados en el LNFCR, INPRFM)
- n) Videocámara digital (Samsung SC-D383/XAX, C.S.)

### 6.3. Fabricación de las nanopartículas.

Se prepararon lotes de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) por medio del método de emulsificación en caliente previamente optimizado en el trabajo de Toledo-Sierra, (2018). En un contenedor adecuado se pesó la cantidad correspondiente a una concentración del 6 % (m/v) de ácido esteárico (AE) y se calentó a 10 °C por encima de su temperatura de fusión (fase oleosa). En otro contenedor se preparó una disolución acuosa de alcohol polivinílico (PVA) correspondiente a una concentración del 5 % (m/v) y se calentó a la misma temperatura que la fase oleosa (fase acuosa). Una vez que ambas fases se encontraron a la misma temperatura, la fase oleosa se adicionó lentamente a la fase acuosa y la mezcla se homogenizó con un agitador de alta velocidad de tipo rotor-estator Ultra-Turrax® T-18 Basic (IKA, Alemania) durante dos ciclos de 5 minutos cada uno a una velocidad de 16 000 rpm. Una representación esquemática de este proceso se muestra en la figura 9. Una vez transcurrido el tiempo de agitación, la dispersión se dejó enfriar a temperatura ambiente. En el caso de los lotes con fenitoína, ésta se solubilizó previamente en la fase oleosa. Tanto los lotes de NLS con fármaco y sin fármaco fueron preparados por triplicado.

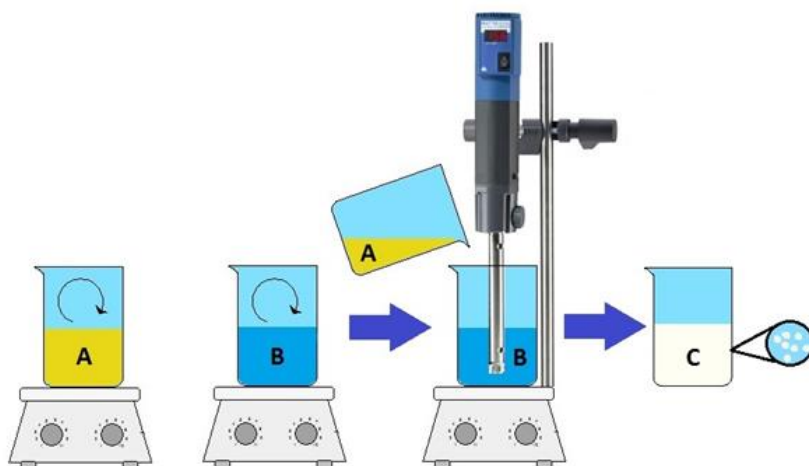


Figura 9. Proceso de fabricación de las NLS por el método de emulsificación en caliente. (A) Fase oleosa. (B) Fase acuosa. (C) NLS.

#### 6.4. Caracterización física.

Una parte importante en el desarrollo de sistemas nanoparticulados es su caracterización ya que los parámetros medidos tienen impacto en la reproducibilidad, estabilidad y por lo tanto efectividad de una formulación.

##### 6.4.1. Tamaño de partícula e Índice de polidispersión.

El tamaño de partícula promedio e índice de polidispersión se midió por triplicado para cada uno de los lotes por medio de dispersión de luz dinámica utilizando el equipo Nanosizer N4 Plus (Coulter Corporation, E.U.A.). Las determinaciones se realizaron a 25 °C a un ángulo de dispersión de 90° siendo las muestras diluidas con agua ultrapura.

##### 6.4.2. Potencial Z.

La medición del potencial Z se realizó mediante microelectroforesis de laser Doppler con el equipo Zetasizer Nano ZS ZEN3600 (Malvern Instruments Limited, Reino Unido). Todas las mediciones se realizaron por triplicado a 25 °C siendo las muestras diluidas con agua ultrapura.

##### 6.4.3. Cuantificación del fármaco encapsulado.

Una vez que los lotes de nanopartículas alcanzaron la temperatura ambiente después del proceso de fabricación éstos se sometieron a un proceso de purificación para eliminar el excedente de estabilizante y de fármaco. Para lo anterior se centrifugaron durante 60 minutos a 40 000 rpm a una temperatura de 15 °C utilizando la ultracentrífuga Optima LE-80K (Beckman, E.U.A.) usando el rotor 50.2 Ti., se separaron los pellets obtenidos del sobrenadante y se lavaron por lo menos tres veces con agua ultrapura. Cada uno de los pellets se resuspendió en disolución de manitol al 7 % (m/v) usada como crioprotector, se congelaron durante 36 h. y se liofilizaron durante 48 h. (Labconco, E.U.A.). Se pesó una cantidad conocida del polvo liofilizado y se solubilizó en metanol, se llevaron a cabo las diluciones necesarias y se realizó la cuantificación del fármaco por cromatografía líquida de alta resolución (Varian ProStar, E.U.A.) con una columna de fase inversa de 4.6 mm x 25 cm x 5µm. Como fase móvil se usó una mezcla

metanol/agua en proporción 55:45 a una velocidad de flujo de 1.5 mL/min., el volumen de inyección fue de 20 µL y la detección del analito se realizó a una longitud de onda de 220 nm. Se determinó la capacidad de carga (CC) de las nanopartículas y la eficiencia de encapsulación del fármaco (EE) por medio de las siguientes ecuaciones:

$$EE (\%) = \frac{\text{Cantidad de PHT encapsulada}}{\text{Cantidad de PHT adicionada}} \times 100 \text{ -----Ec. 1}$$

$$CC (\%) = \frac{\text{Cantidad de PHT en NLS}}{\text{Cantidad de NLS}} \times 100 \text{ -----Ec. 2}$$

### 6.5. Cirugía estereotáxica.

Para la medición de la actividad eléctrica cerebral en los animales de experimentación primeramente fue necesaria la implantación de electrodos de registro a través del cráneo hasta alcanzar la superficie de la corteza cerebral, los cuales consistieron en tornillos de acero inoxidable de 1.2 mm de diámetro y de 2.8 mm de largo a los que se les soldó un segmento de alambre de acero inoxidable.

#### 6.5.1. Animales.

Se utilizaron ratones macho de la cepa Swiss Webster de entre 30 a 34 gramos de peso y de 5 semanas de edad aproximadamente proporcionados por el bioterio del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz. En total se utilizaron 30 ratones realizándose los esfuerzos necesarios para optimizar el número de animales usados en los experimentos cumpliéndose también con las disposiciones indicadas en la NOM-062-ZOO-1999 por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación en materia de producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. Los animales se mantuvieron a una temperatura de 20 °C y en ciclos de luz/obscuridad de 12 h./12 h. dotándolos de alimento y agua *ad-libitum*.

### 6.5.2. Colocación de electrodos.

Para la implantación de los electrodos, los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina/xilazina a una dosis de 100 mg/kg y de 13.3 mg/kg respectivamente, la cual fue aplicada intraperitonealmente. La profundidad de la anestesia fue verificada cualitativamente evaluando diferentes signos como la pérdida del reflejo de enderezamiento, pérdida de reflejo palpebral, así como la frecuencia y profundidad de la respiración del animal. Una vez alcanzado el grado de anestesia quirúrgica, el animal fue inmovilizado en el aparato estereotáxico (Stoelting Co., E.U.A.), se rasuró y se limpió la zona craneal con solución de yodo y con la ayuda de un bisturí se realizó un corte en sentido anteroposterior de aproximadamente 15 mm de longitud, se retiró el periostio con agua oxigenada para finalmente dejar expuesto en cráneo. Todo el material quirúrgico empleado, así como el material implantado fue previamente esterilizado en disolución de cloruro de benzalconio.

De acuerdo, al atlas de Paxinos y Franklin (2001), se realizaron 4 trépanos con el micromotor (Foredom 21b, E.U.A.) sobre el cráneo de animal; uno sobre cada corteza frontal con coordenadas estereotáxicas +2 mm. anteroposterior y  $\pm 1$  mm. mediolateral de bregma y uno sobre cada corteza parietal con coordenadas estereotáxicas -3 mm. anteroposterior y  $\pm 2.5$  mm mediolateral de bregma (figura 10). Un electrodo más fue colocado sobre el cerebelo con la finalidad de ser la referencia para cada uno de los electrodos implantados.

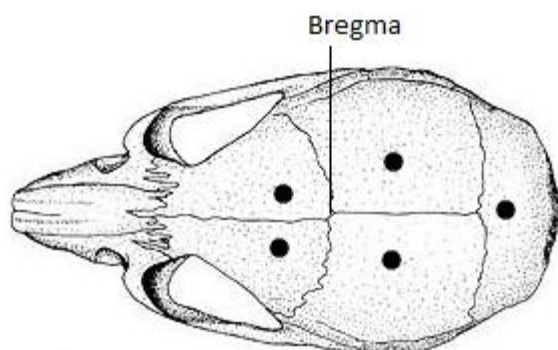


Figura 10. Localización de los electrodos implantados en los animales de experimentación.

Los electrodos se soldaron a un *header* (figura 11) y fueron recubiertos con acrílico dental cuidando que la zona craneal expuesta quedara completamente cubierta, así como evitando que quedaran burbujas de aire dentro del implante. Posterior a la cirugía, los animales tuvieron un periodo de recuperación de 7 días antes de la realización de los experimentos siendo colocados en cajas individuales con agua y alimento *ad-libitum*.



Figura 11. Tablilla de conexión o *header* utilizado como conector entre los implantes y el sistema de registro EEG.

## 6.6. Medición de la actividad eléctrica cerebral

### 6.6.1. Grupos de experimentación.

Los animales fueron separados en 5 grupos (n=6) como se indica en la tabla 2, aplicándose los tratamientos por vía intraperitoneal a la dosis indicada:

Tabla 2. Grupos de experimentación para la evaluación del efecto anticonvulsivo.

<b>Grupo</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>Tratamiento</b>	Solución Salina	Mezcla física (PHT + AE)	NLS	NLS/PHT	PHT
<b>Dosis</b>	10 ml/kg	100 mg/kg	100 mg/kg	100 mg/kg	100 mg/kg

La mezcla física fue preparada en función de la relación de las proporciones utilizadas de ambos componentes en la fabricación de las nanopartículas con fenitoína.

### 6.6.2. Registro de los electroencefalogramas e inducción de crisis convulsivas.

El animal se colocó dentro de la cámara de registro (30 mm x 25 mm x 18 mm) y tuvo un periodo de habituación al entorno de por lo menos 30 minutos para posteriormente ser conectado al polígrafo con amplificadores 7PK511 (GRASS Instruments Co.) con las siguientes configuraciones: filtro pasa banda 3-300 Hz, sensibilidad de 50  $\mu$ V y filtro de 60 Hz activado. La señal analógica fue digitalizada y registrada por computadora por medio del sistema de adquisición ADQCH8 (desarrollado en el Laboratorio de Neurofisiología del Control y la Regulación de Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz) muestreando a una frecuencia de 1000 Hz.

Se comenzó a registrar la actividad electroencefalográfica (EEG) en estado basal durante 10 minutos y una vez transcurridos, se aplicó en tratamiento correspondiente según el grupo de experimentación y se registró la actividad EEG durante 30 minutos, después, se aplicó el pentilentetrazol (PTZ) a una dosis de 85 mg/kg vía i.p. y se registró la actividad convulsiva EEG y la actividad conductual durante 30 minutos más (figura 12).

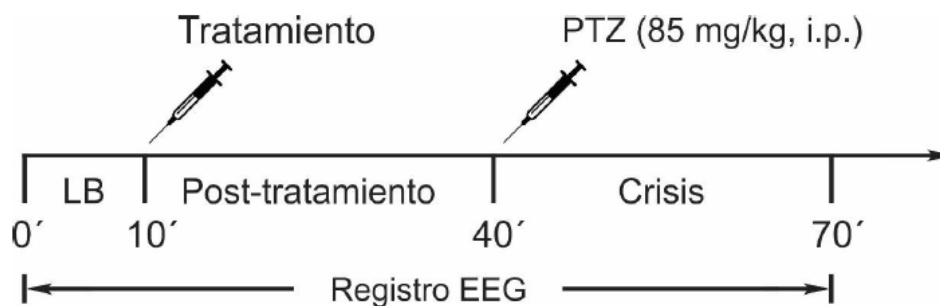


Figura 12. Diagrama de la línea temporal del registro de la actividad EEG.

Todos los experimentos fueron videograbados con la finalidad de poder correlacionar la actividad eléctrica registrada con la actividad conductual observada y tener mayor precisión en la identificación de todos los estados conductuales característicos de las crisis convulsivas inducidas por la actividad del PTZ.



Es importante mencionar que con la dosis de PTZ utilizada es posible alcanzar en los animales de experimentación las crisis convulsivas más severas y así poder comparar el efecto que tienen sobre éstas los diferentes tipos de tratamientos aplicados.

De los registros EEG obtenidos se contabilizaron los tiempos de latencia transcurridos desde la aplicación del PTZ hasta la aparición de los *neck jerks*, la primera crisis clónica y la primera crisis tónico-clónica así como la duración de éstas dos últimas. También se registró la incidencia tanto de las crisis clónicas, las crisis tónico-clónicas y la incidencia de la muerte.

### 6.7. Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos fueron recopilados y ordenados en una hoja de cálculo de Microsoft Excel® y posteriormente analizados mediante los softwares estadísticos STATGRAPHICS Centurion XV® (versión 15.2.05) y GraphPad PRISM® (versión 6.01). Se aplicaron pruebas paramétricas en caso de que los datos tuvieran una distribución normal de lo contrario se aplicaron pruebas no paramétricas. Los tiempos de latencia a los *neck jerks*, la primera crisis clónica y la primera crisis tónico-clónica así como su duración fueron analizados mediante ANOVA de una vía con tratamiento *post hoc* de Bonferroni. En el caso de las incidencias a las crisis clónicas, crisis tónico-clónicas y la incidencia a la muerte se analizaron mediante la prueba *chi* cuadrada de Pearson. Se estableció la significancia estadística con valores  $P < 0.05$ .

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 7.1. Fabricación y caracterización de las NLS.

En la tabla 3 se muestran los resultados de la caracterización de las nanopartículas obtenidas por el método de emulsificación en caliente usando ácido esteárico como matriz lipídica y fenitoína como fármaco modelo.

Tabla 3. Resultados de la caracterización física de las NLS.

<b>Tamaño de partícula (nm)</b>	388.6 ± 3.5
<b>Índice de polidispersión</b>	0.107 ± 0.031
<b>Potencial Z (mV)</b>	- 33.4 ± 1.2
<b>Capacidad de carga (%)</b>	23.4
<b>Eficiencia de atrapamiento (%)</b>	2.3

Uno de los principales factores que tienen influencia en la efectividad de los nanotransportadores como sistemas de liberación de activos es la distribución del tamaño de partícula y la carga superficial de la misma. Estos parámetros están relacionados directamente tanto con la naturaleza química y las concentraciones de los componentes utilizados en la formulación, así como con los aspectos tecnológicos del proceso de fabricación. Diversos estudios han demostrado la relación que guarda el incremento en la fracción volumétrica de la fase lipídica y el aumento observado en el tamaño de partícula (Blasi et al., 2013; Lippacher et al., 2003) en los que el método de fabricación involucra un proceso de emulsificación. Se piensa que una de las posibles explicaciones para este comportamiento se debe al hecho de que un aumento en la proporción de fase interna, siendo esta la fase lipídica, conlleva a un aumento de la viscosidad del sistema modificando sus propiedades reológicas por lo que también se vería modificado el proceso de homogenización. El resultado de lo anterior es que incrementando la proporción de fase lipídica se obtienen tamaños de partícula mayores y viceversa.

Otro de los aspectos relevantes relacionado al tamaño de partícula de los sistemas utilizados es en lo referente a los procesos de depuración de agentes extraños de la circulación sistema por parte del sistema retículo endotelial (SRE) del organismo. Este proceso de depuración depende principalmente del tamaño de partícula y de la carga superficial en el que las partículas con distintos grados de hidrofobicidad pueden ser opsonizadas o fagocitadas en poco tiempo por diversos componentes plasmáticos del SER (Moghimi et al., 2001). Una forma de evitar este proceso es disminuyendo el tamaño de partícula para aumentar la probabilidad que los acarreadores puedan alcanzar su sitio de acción (Moghimi et al., 1991). Como puede verse en la tabla 3, se obtuvieron nanopartículas con un diámetro promedio de 384 nm. El potencial Z es un indicativo de la carga superficial de las nanopartículas el cual está relacionado con la estabilidad física del sistema. Mediciones de potencial Z altos en valor absoluto (positivos o negativos) indican que las partículas tendrán menores posibilidades de experimentar los fenómenos de inestabilidad propios de los sistemas dispersos como la floculación, coalescencia, etc., (Fredrick et al., 2010) lo que les permitirá mantener su tamaño original y así lograr obtener el resultado deseado.

En cuanto a los parámetros del proceso de fabricación, por lo regular, el aumento en el tiempo de agitación, así como en la velocidad de agitación producen tamaños de partícula menores ya que el sistema estaría sometido durante mayor tiempo a las grandes fuerzas de corte que se generan durante el proceso de homogenización a alta velocidad donde el fenómeno de cavitación juega un papel importante en la reducción del tamaño de partícula. Es importante resaltar que este comportamiento también puede ser dependiente de las características propias de cada formulación ya que también se ha observado que se puede alcanzar un punto en el que el incremento tanto del tiempo como de la velocidad ya no producen cambios significativos en el tamaño de partícula obtenido (Soni et al., 2020). La capacidad de carga y la eficiencia de entrapamiento se relacionan con el grado de interacción existente entre el lípido y el fármaco siendo importante el grado de cristalinidad y la forma polimórfica que exhiben los componentes que a su vez guarda relación con la hidrofiliidad/lipofiliidad de los mismos. La solubilidad del fármaco en el lípido es uno de los factores limitantes que influenciarán la

cantidad de fármaco que podrá ser retenido por la matriz lipídica y por lo tanto su capacidad de carga.

## 7.2. Obtención de los registros EEG.

### 7.2.1. Estado basal.

Una vez que el animal se conectó al polígrafo comenzó a registrarse la actividad cerebral en estado basal. En la figura 13 se puede visualizar parte del trazo obtenido en esta etapa del registro.

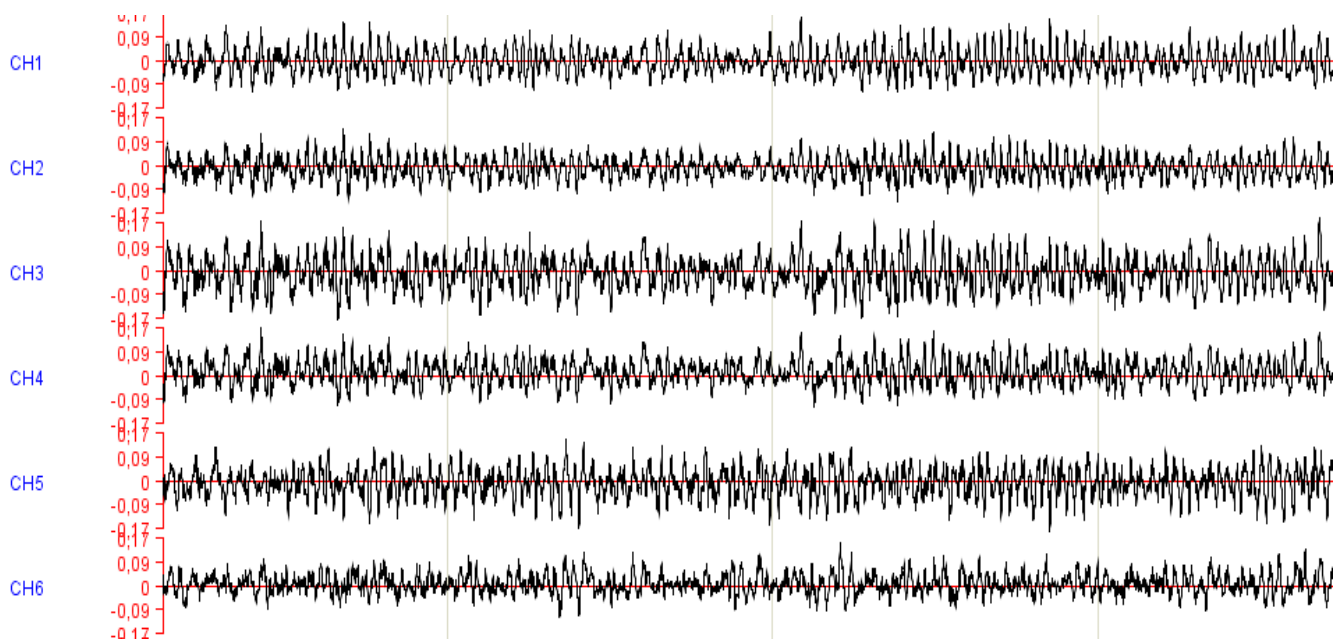


Figura 13. Registro EEG en estado basal.

La actividad basal tiene como componentes característicos principales ondas de baja frecuencia y de bajo voltaje lo que representa que son de baja amplitud mientras en animal se encuentra en reposo sin ningún estímulo externo de importancia que modifique su comportamiento tanto conductual como electrofisiológico. El registro de la actividad basal tiene como objetivo que las señales observadas en el EEG no se vean influenciadas por cualquier otro tipo de actividad

inducida intencional o inconsciente como consecuencia de la manipulación que pueda perturbar la respuesta observada al administrar los tratamientos de interés. Este comportamiento de actividad basal se observó en todos los grupos de estudio ya que aún no se aplicaba ningún tratamiento.

### 7.2.2. Tratamientos.

Después de registrada la actividad basal se administró la mezcla física/NLS/NLS-PHT/PHT dependiendo del grupo de experimentación. La mezcla física se utilizó como tratamiento con el objetivo de estudiar si la talla nanométrica de los sistemas utilizados era lo que condicionaba el efecto observado o si la mezcla fármaco-lípido mostraba un efecto en sí considerando que la fenitoína por si misma tiene propiedades anticonvulsivantes. En la figura 14 se muestra un trazo representativo del registro EEG después de aplicar la mezcla física.

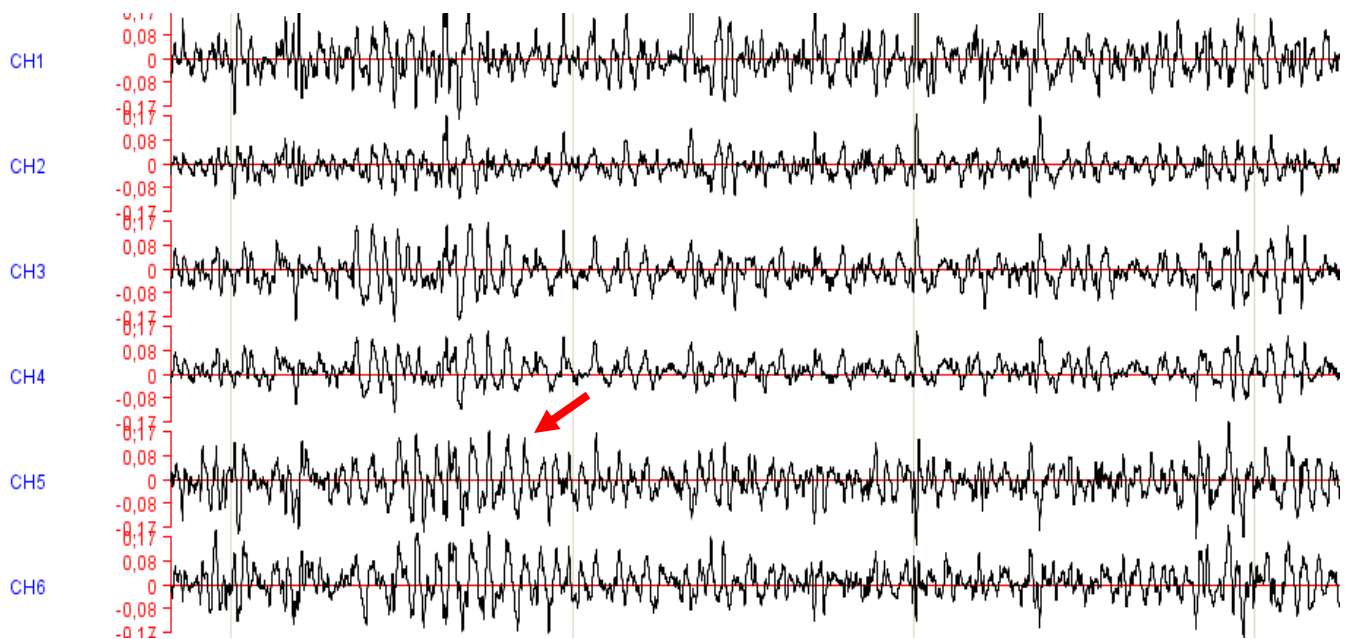


Figura 14. Registro EEG después de administrar la mezcla física.

Como se puede observar en la figura 14, la mezcla física genera un cambio en la señal del registro EEG con respecto a la actividad basal notándose que, en ciertas zonas como la señalada mediante la flecha roja, las ondas presentan menor amplitud, es decir, menor voltaje además de disminuir su frecuencia. Este tipo de señal es lo que se conoce como sueño de ondas lentas, una de las etapas típicas del sueño, aunque lo particular en este caso es que el animal se encontraba despierto, pero con cierto grado de quietud por algunos momentos. Lo anterior es indicativo de que la mezcla física induce un estado de relajación o cierto efecto ansiolítico que tiene sentido por el hecho de que se encuentra presente la fenitoína.

En la figura 15 se muestra el registro obtenido al administrar las NLS sin fármaco. Esta formulación se aplicó para verificar si era capaz por si sola de inducir algún efecto anticonvulsivo tomando en consideración su naturaleza lipídica similar a la de la membrana celular, así como su tamaño submicrónico.

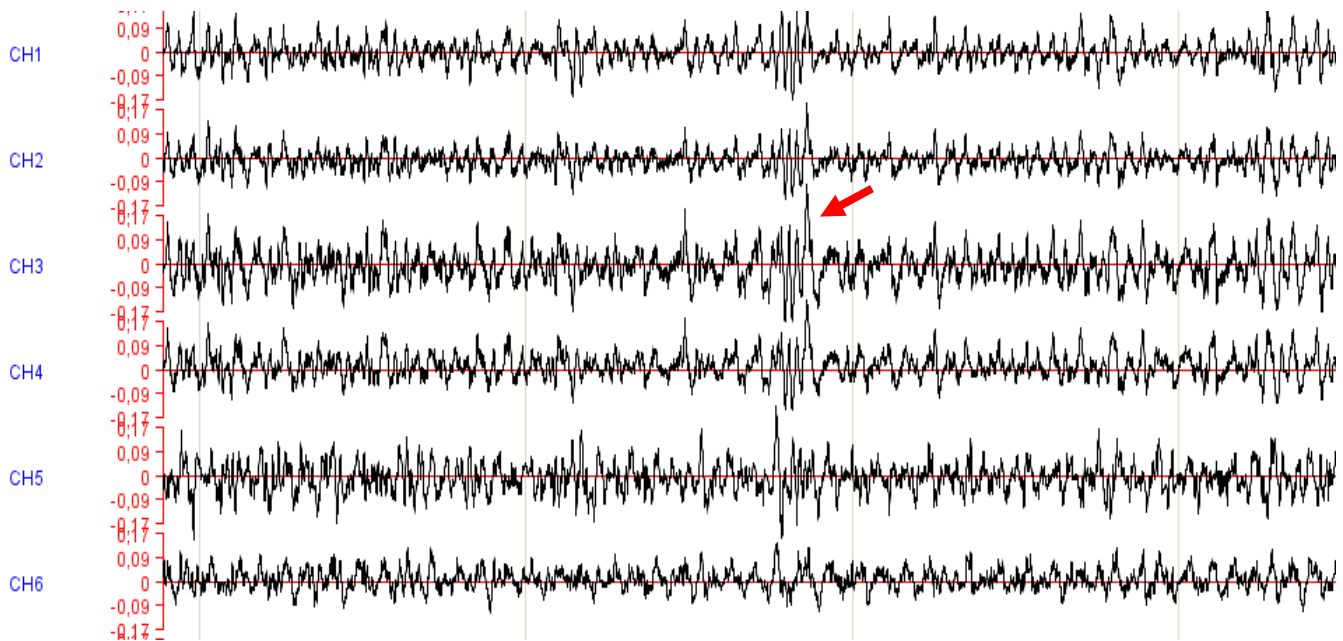


Figura 15. Registro EEG después de administrar NLS.

En este caso, disminuye la frecuencia, pero aumenta un poco la amplitud, en relación a, lo obtenido en el registro del estado basal, además de observarse nuevamente las señales características del sueño de ondas lentas (indicado con la flecha roja) aunque con mayor frecuencia si se compara con estas mismas señales del EEG de la mezcla física. Lo particular en este registro es que se trata de las nanopartículas sin fármaco por lo que se evidencia que al menos electrofisiológicamente, existe cierto grado de efecto ansiolítico inducido únicamente por el lípido en forma de nanopartículas.

En la figura 16 podemos observar las señales registradas como resultado de la administración de las nanopartículas con fenitoína.

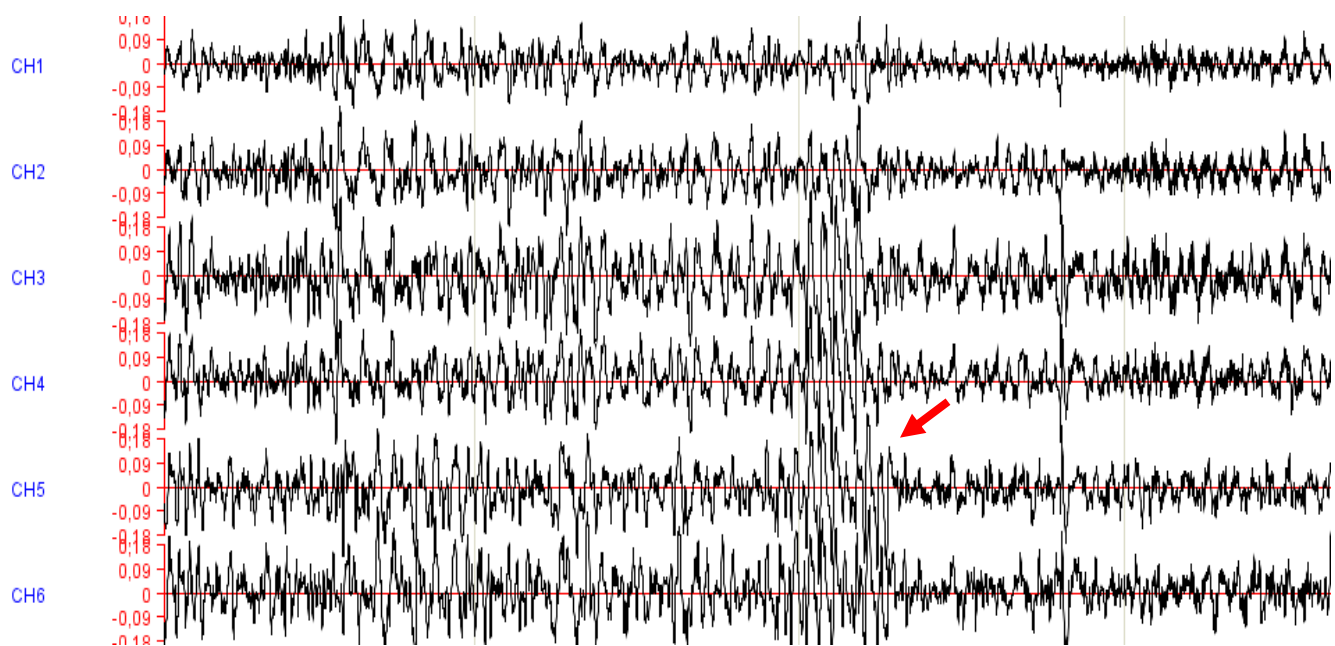


Figura 16. Registro EEG después de administrar NLS/PHT.

Nuevamente se observa la presencia de sueño de ondas lentas, aunque esta vez con mucho mayor amplitud y de frecuencia similar a las obtenidas con las nanopartículas sin fármaco.

También es posible observar una mayor densidad de estas a lo largo del registro combinadas con lapsos de señales similares a las de la medición basal.

Por último, en los trazos de la figura 17, se muestra el registro correspondiente después de administrar solamente la fenitoína. Se puede observar que en este caso no se presentan las señales correspondientes al sueño de ondas lentas, pero a diferencia del registro EEG en estado basal, disminuye la frecuencia de las ondas aumentando un poco su amplitud.

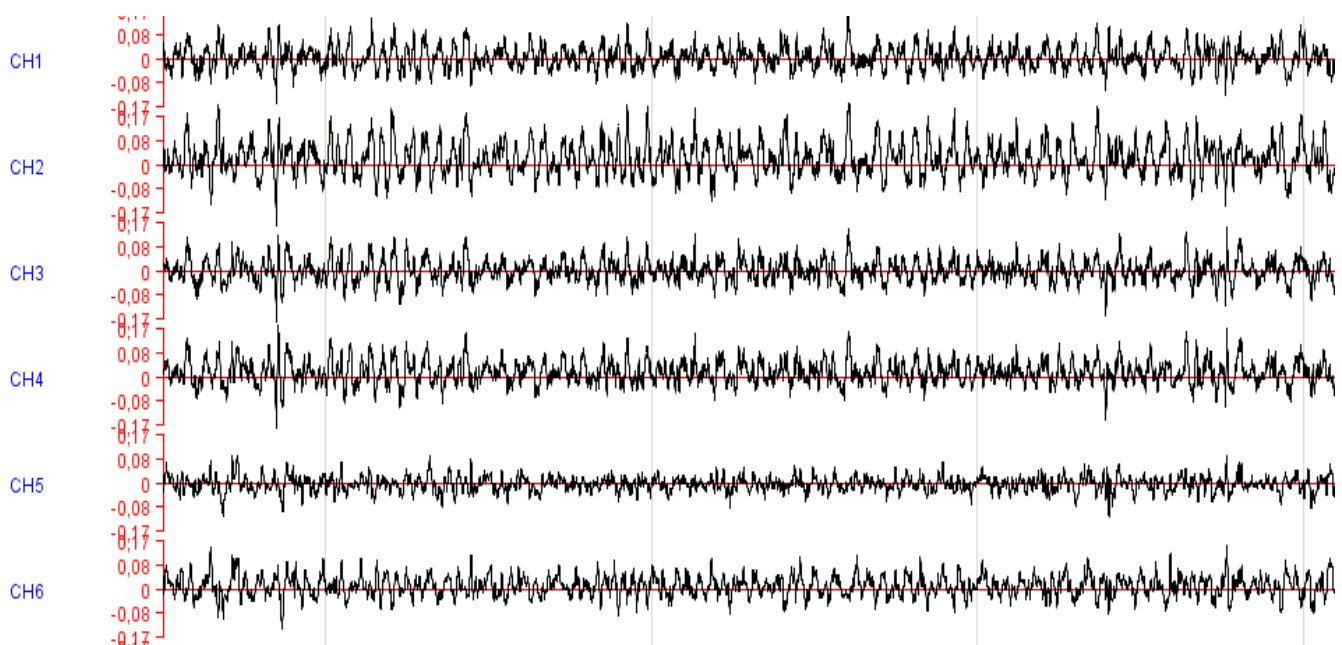


Figura 17. Registro EEG después de administrar PHT.

### 7.2.3. Pentilentetrazol.

Una vez transcurrido el tiempo de registro tanto de la línea base como de los tratamientos, se realizó la administración del PTZ. Una de las ventajas de los modelos agudos es que es posible observar de manera inmediata distintas etapas de las crisis convulsivas y que por medio de la obtención de los registros EEG podemos caracterizar los componentes electrográficos asociados a ellas. Uno de los primeros fenómenos observados tanto conductual como en el



registro (figura 18) es la aparición de los *neck jerks*, en la figura señalado con la flecha roja, en los que el animal experimenta fuertes contracciones en los músculos del cuello sin perder la postura y electrográficamente se observan espigas de alto voltaje (gran amplitud) pero de corta duración.

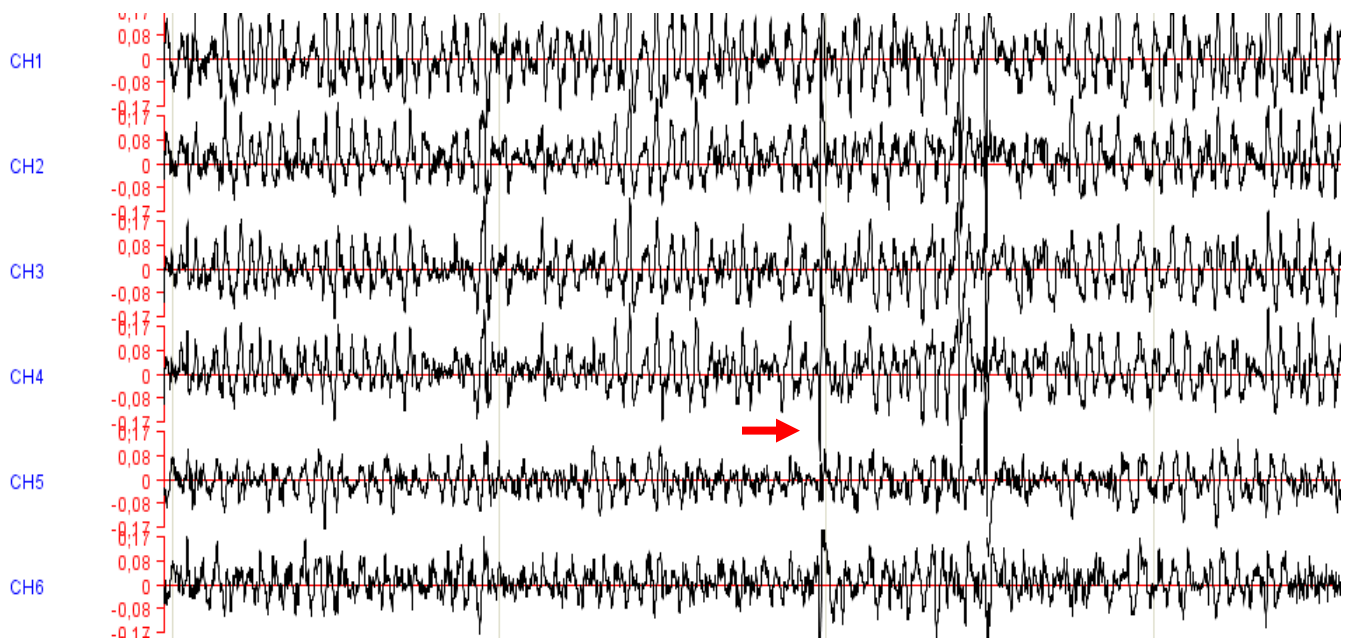


Figura 18. Registro EEG después de administrar PTZ. Etapa *neck jerks*.

Las otras etapas de las crisis epilépticas estudiadas en este proyecto fueron la clónica y la tónico-clónica. Conductualmente las crisis clónicas se caracterizan por la presencia de rápidos espasmos musculares que recorren el cuerpo del animal experimentando fuertes sacudidas que incluso pueden provocar pérdida de la postura. Electrográficamente se observan descargas de alto voltaje con un aumento rápido en la frecuencia entre una y otra (poliespigas), como se muestra en la figura 19, con varios segundos de duración seguidas de lapsos de señales de baja amplitud entre una crisis y otra.

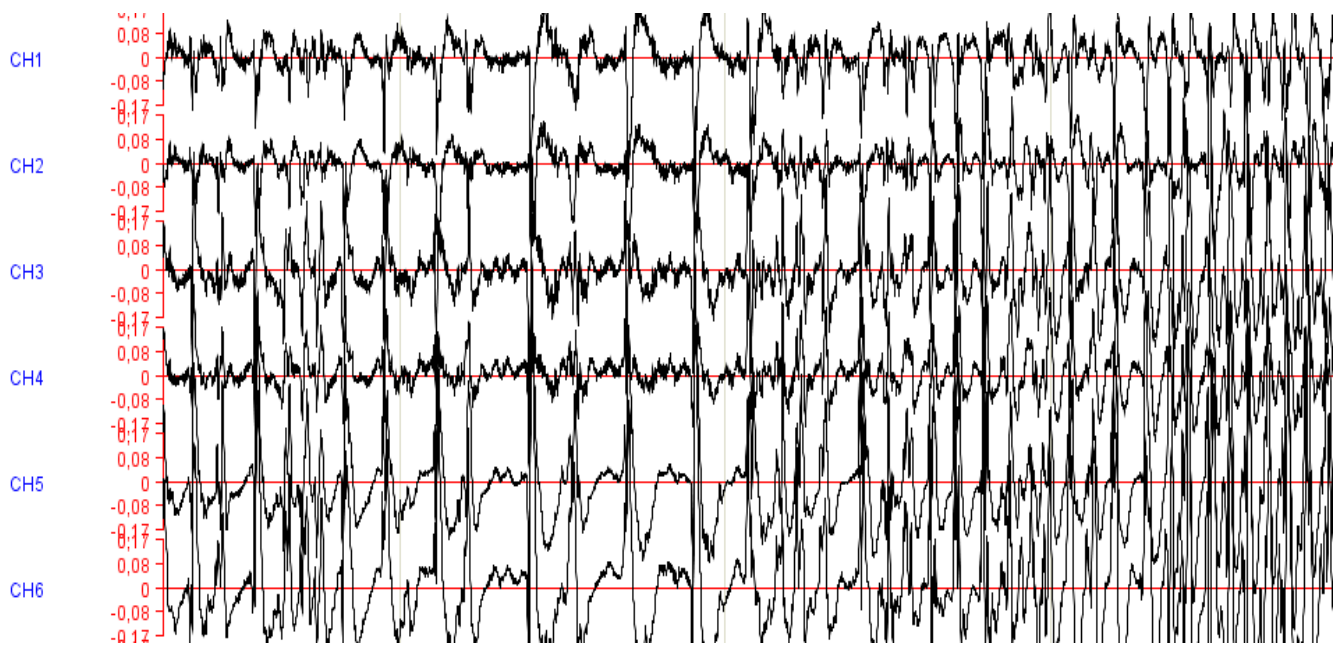


Figura 19. Registro EEG después de administrar PTZ. Etapa crisis clónica.

En las crisis tónico-clónicas, el animal pierde por completo la postura presentando extensión tónica de las extremidades siendo también una característica de esta etapa la aparición de brincos salvajes. En el registro EEG se observan descargas de alto voltaje y alta frecuencia que cubren por completo el trazo (figura 20).

Analizando todos los cambios electrográficos que se acaban de describir, fue posible llevar a cabo la medición de los tiempos de latencia de aparición de los *neck jerks*, las crisis clónicas y las crisis tónico-clónicas así como las incidencias de tales eventos además de cuantificar el tiempo de duración tanto de las crisis clónicas como de las tónico clónicas. En la figura 21, se muestra un diagrama temporal de la sucesión de estos eventos y los cambios electrográficos observados durante su registro.

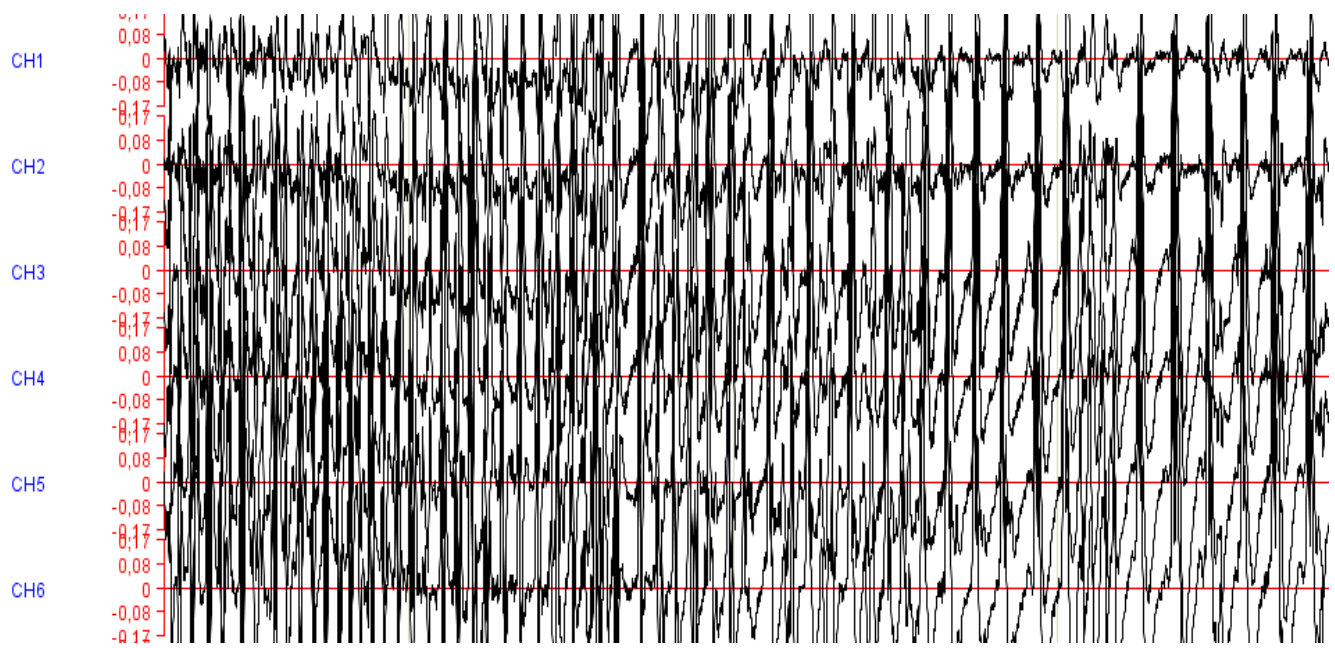


Figura 20. Registro EEG después de administra PTZ. Etapa crisis tónico-clónica.

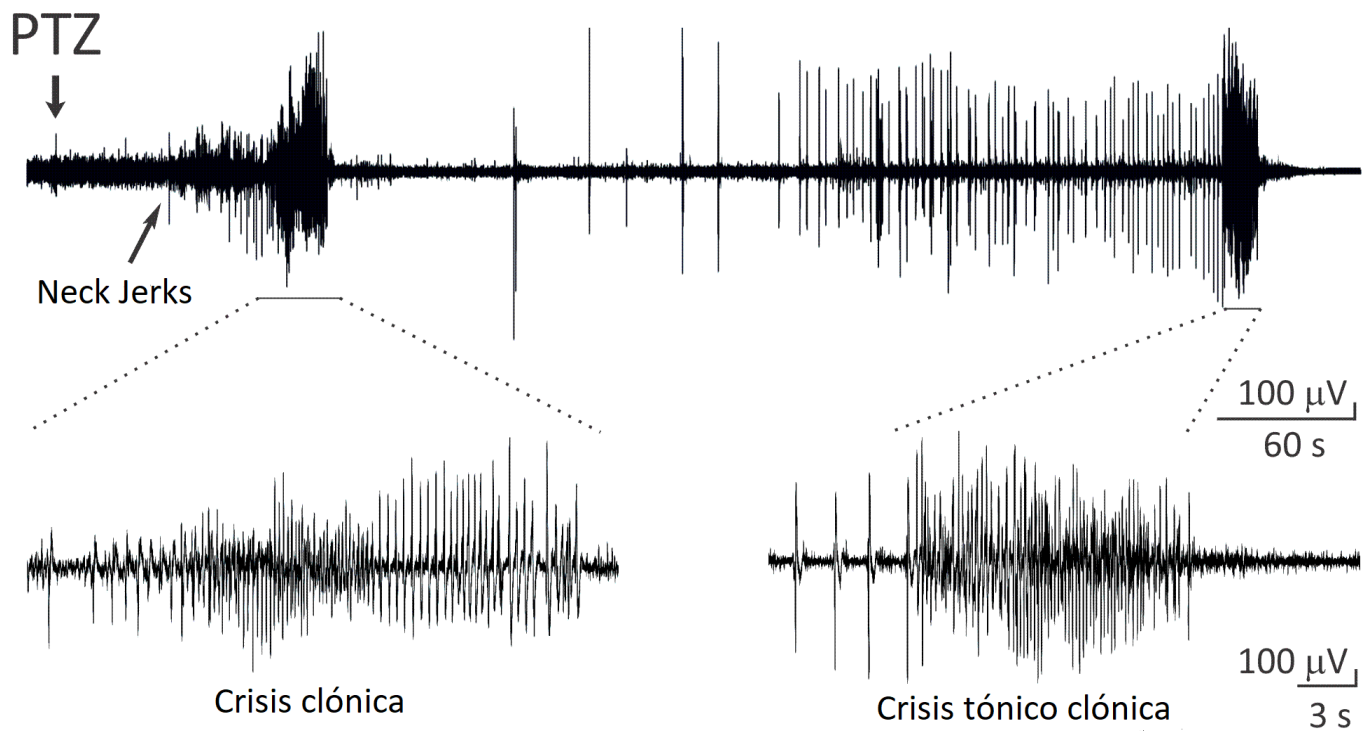


Figura 21. Representación esquemática de la sucesión de los eventos evaluados mediante el registro EEG.

### 7.3. Evaluación de la actividad anticonvulsiva.

#### 7.3.1. Neck Jerks.

En las figuras 22 y 23 se muestran los resultados de incidencia y tiempos de latencia respectivamente de aparición de los *neck jerks* de cada uno de los tratamientos aplicados.

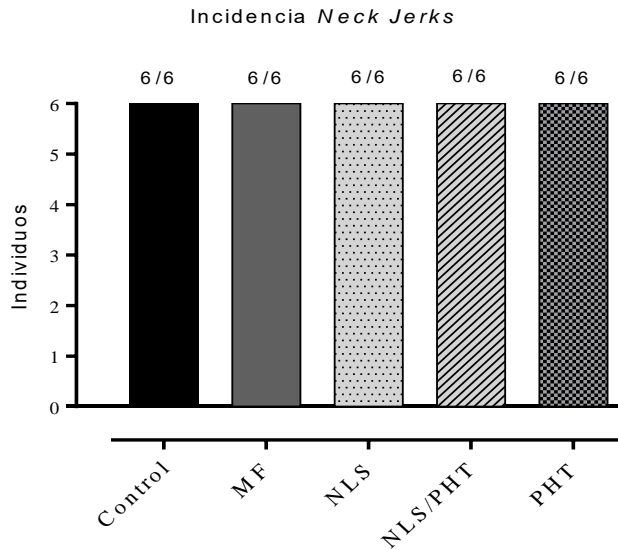


Figura 22. Incidencia de *Neck Jerks* de cada grupo experimental.

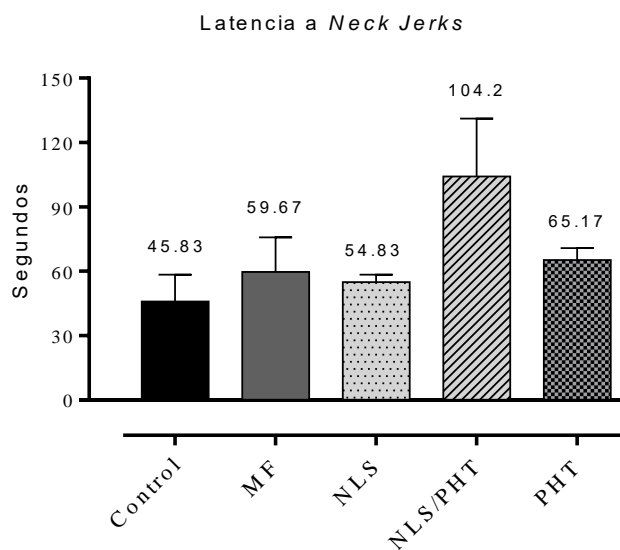


Figura 23. Tiempo de latencia a *Neck Jerks* de cada grupo experimental.

Una vez que el PTZ es administrado, este empieza a ejercer su efecto de manera casi inmediata y como se mencionó con anterioridad, uno de los primeros eventos asociados a crisis convulsivas que se pueden apreciar son los *neck jerks*. Como se puede observar en la figura 22, en todos los animales de cada grupo experimental se presentó este fenómeno, por lo que ninguno de los tratamientos aplicados es capaz de bloquear estas descargas de alto voltaje y en la figura 23 se observa que el tiempo de latencia es muy cercano a los 60 segundos para todos los casos excepto en el grupo NLS/PHT en el que se aproxima más a los 120 segundos, es decir, casi el doble de tiempo. Para saber si existen diferencias significativas con respecto al tiempo de latencia de este evento que se puedan asociar a la efectividad de algún tratamiento en esta etapa de las crisis se realizó el análisis de varianza de una vía arrojando que tales diferencias no existen con un 95 % de confianza (tabla 4 y 5) ya que el valor P es mayor a 0.05, aunque el tiempo de latencia mostrada por las NLS/PHT fue mayor con respecto a los demás grupos, es decir, los *neck jerks* tardan más en presentarse cuando se administra este tratamiento aún comparado con la PHT por si sola.

Tabla 4. ANOVA para latencia a *Neck Jerks* por condición.

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Entre grupos	12173,20	4	3043,30	2,13	0,11
Intra grupos	35724,70	25	1428,99		
Total (Corr.)	47897,90	29			

Tabla 5. Prueba de Múltiples Rangos para latencia a *Neck Jerks* por condición. (Método: 95.0 % Bonferroni).

<b>Condición</b>	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
Control	6	45,83	X
NLS	6	54,83	X
Mezcla física	6	59,67	X
PHT	6	65,17	X
NLS/PHT	6	104,20	X

La importancia de caracterizar el comportamiento de los *neck jerks* radica en el hecho de que se trata del primer evento paroxístico inducido por la actividad de PTZ sobre los sujetos de experimentación.

### 7.3.2. Crisis clónica.

En primer lugar, se analizó la incidencia de las crisis clónicas por medio de la aplicación de la prueba *chi* cuadrada de Pearson cuando se construyen tablas de frecuencias (también conocidas como tablas de contingencia) en donde se evalúa si existe alguna relación estadísticamente significativa entre la presencia o ausencia de algún evento, en este caso las crisis clónicas, con un tratamiento que pudiera inducir que tal evento se produzca o no. En la figura 24 se puede observar que las crisis clónicas se presentan en todos los animales de los grupos control, mezcla física y NLS mientras que en el grupo NLS/PHT solo 5 las presentan y en grupo PHT solo 4.

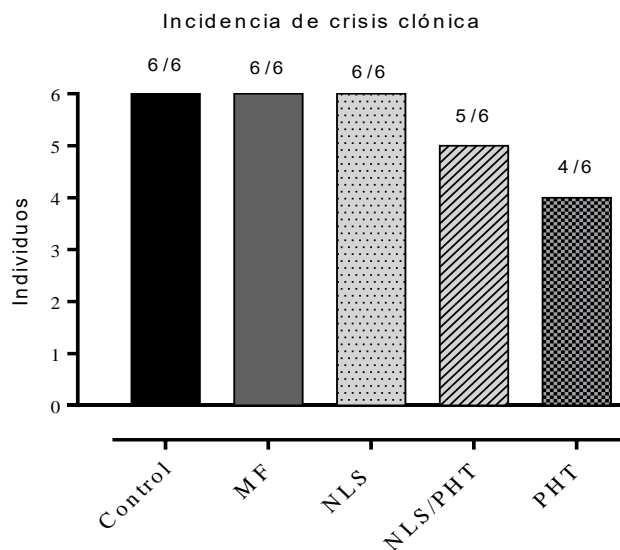


Figura 24. Incidencia de crisis clónica de cada grupo experimental.

En las tablas 6 a 19 se puede observar los resultados de tales pruebas. El hecho que en el grupo NLS/PHT un animal no haya experimentado crisis clónicas y en grupo PHT en dos animales no hayan sucedido no significa que esto sea resultado del efecto de los tratamientos por lo que el evento es independiente de la actividad de estos con un 95.0 % de confianza ya que los valores de P son mayores a 0.05. En otras palabras, ni las NLS/PHT ni la PHT son capaces de reducir la incidencia de aparición de crisis clónicas.

Tabla 6. Frecuencias para Condición/Incidencia crisis clónica. Control vs NLS/PHT.

	No presenta	Sí presenta	Total por Fila
<b>Control</b>	0	6	6
<b>NLS/PHT</b>	1	5	6
Total por Columna	1	11	12

Tabla 7. Prueba de independencia. Control vs NLS/PHT.

<i>Prueba</i>	<i>Estadístico</i>	<i>Gl</i>	<i>Valor-P</i>
Chi-Cuadrada	1,091	1	0,296

Tabla 8. Frecuencias para Condición/Incidencia crisis clónica. Control vs PHT.

	No presenta	Sí presenta	Total por Fila
<b>Control</b>	0	6	6
<b>PHT</b>	2	4	6
Total por Columna	2	10	12

Tabla 9. Prueba de independencia. Control vs PHT.

<i>Prueba</i>	<i>Estadístico</i>	<i>Gl</i>	<i>Valor-P</i>
Chi-Cuadrada	2,400	1	0,121

Tabla 10. Frecuencias para Condición/Incidencia crisis clónica. Mezcla física vs NLS/PHT.

	No presenta	Sí presenta	Total por Fila
<b>Mezcla física</b>	0	6	6
<b>NLS/PHT</b>	1	5	6
Total por Columna	1	11	12

Tabla 11. Prueba de independencia. Mezcla física vs NLS/PHT.

<i>Prueba</i>	<i>Estadístico</i>	<i>Gl</i>	<i>Valor-P</i>
Chi-Cuadrada	1,091	1	0,296

Tabla 12. Frecuencias para Condición/Incidencia crisis clónica. Mezcla física vs PHT.

	No presenta	Sí presenta	Total por Fila
<b>Mezcla física</b>	0	6	6
<b>PHT</b>	2	4	6
Total por Columna	2	10	12

Tabla 13. Prueba de independencia. Mezcla física vs PHT.

<i>Prueba</i>	<i>Estadístico</i>	<i>Gl</i>	<i>Valor-P</i>
Chi-Cuadrada	2,400	1	0,121

Tabla 14. Frecuencias para Condición/Incidencia crisis clónica. NLS vs NLS/PHT.

	No presenta	Sí presenta	Total por Fila
<b>NLS/PHT</b>	1	5	6
<b>NLS</b>	0	6	6
Total por Columna	1	11	12

Tabla 15. Prueba de independencia. NLS vs NLS/PHT.

<i>Prueba</i>	<i>Estadístico</i>	<i>Gl</i>	<i>Valor-P</i>
Chi-Cuadrada	1,091	1	0,296

Tabla 16. Frecuencias para Condición/Incidencia crisis clónica. NLS vs PHT.

	No presenta	Sí presenta	Total por Fila
<b>NLS</b>	0	6	6
<b>PHT</b>	2	4	6
Total por Columna	2	10	12

Tabla 17. Prueba de independencia. NLS vs PHT.

<i>Prueba</i>	<i>Estadístico</i>	<i>Gl</i>	<i>Valor-P</i>
Chi-Cuadrada	2,400	1	0,121



Tabla 18. Frecuencias para Condición/Incidencia crisis clónica. NLS/PHT vs PHT.

	No presenta	Sí presenta	Total por Fila
NLS/PHT	1	5	6
PHT	2	4	6
Total por Columna	3	9	12

Tabla 19. Prueba de independencia. NLS/PHT vs PHT.

Prueba	Estadístico	Gl	Valor-P
Chi-Cuadrada	0,444	1	0,505

Para que este tipo de análisis pueda llevarse a cabo, el método requiere que en al menos uno de los grupos de estudio haya tanto individuos que presenten el evento como individuos que no lo presenten, de lo contrario, este no se puede realizar. Es por lo anterior que si entre los pares de grupos que se analizan todos los sujetos presentan el evento, no se muestran esas tablas de resultados.

En cuanto a los tiempos de latencia de las crisis clónicas los resultados se muestran en la figura 25.

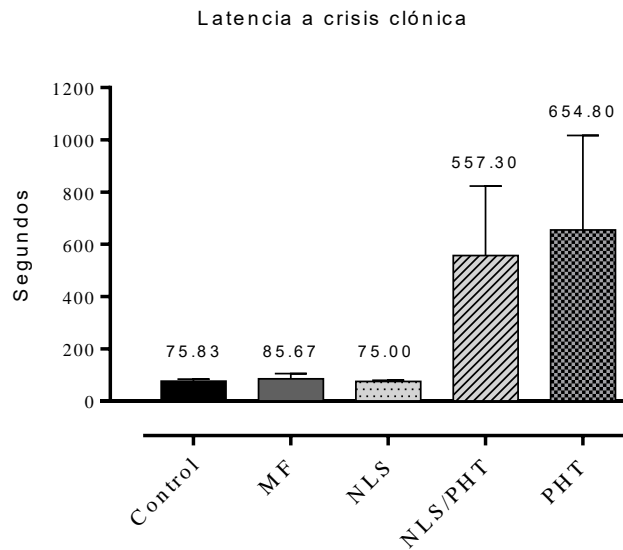


Figura 25. Tiempo de latencia a crisis clónica de cada grupo experimental.

En los grupos NLS/PHT y PHT se observa que el tiempo de latencia es mucho mayor (por lo menos 7 veces más) con respecto a los grupos control, mezcla física y NLS siendo mayor el tiempo que tardan en presentarse las crisis clónicas aunque después de realizar el análisis de varianza correspondiente se encontró que tales diferencias no son estadísticamente significativas con 95.0 % de confianza ya que el valor de P es mayor a 0.05 (tablas 20 y 21). En el caso de la mezcla física y las NLS los tiempos de latencia son similares a los obtenidos en el grupo control no siendo capaces de retardar el tiempo de aparición de las crisis clónicas.

Tabla 20. ANOVA para latencia a crisis clónica por condición.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	2,03E6	4	507622,00	2,09	0,11
Intra grupos	6,07E6	25	242952,00		
Total (Corr.)	8,10E6	29			

Tabla 21. Prueba de Múltiples Rangos para latencia a crisis clónica por condición (Método: 95.0 % Bonferroni).

<i>Condición</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
NLS	6	75,0	X
Control	6	75,83	X
Mezcla física	6	85,67	X
NLS/PHT	6	557,33	X
PHT	6	654,83	X

En el caso de la mezcla física, aunque está presente la PHT esta no puede ejercer su efecto ya que se encuentra presente también el ácido esteárico. Dejando un poco de lado la significancia estadística arrojada en el análisis de varianza, se observa que las NLS/PHT retrasan poco menos de 8 veces la aparición de las crisis clónicas con respecto al grupo control mientras que la PHT lo hace casi 9 veces también con respecto al grupo control. Si se hace la comparación entre estos dos grupos, existe una diferencia de casi 100 segundos entre uno y otro siendo aún mayor el tiempo de latencia para la PHT.

Analizando los resultados de la duración de las crisis clónicas mostrados en la figura 26, se observa que el mayor tiempo lo presenta el grupo control con una media de 20.33 segundos. En los demás grupos se obtienen tiempos menores, aunque estos no son significativamente diferentes, de acuerdo con el análisis de varianza mostrados en las tablas 22 y 23 aplicado sobre estos datos, es decir, ninguno de los tratamientos tiene efecto sobre la duración de este tipo de crisis. Una vez que estas llegan a presentarse, independientemente del tiempo que tardan en aparecer, prácticamente tienen la misma duración en todos los casos.

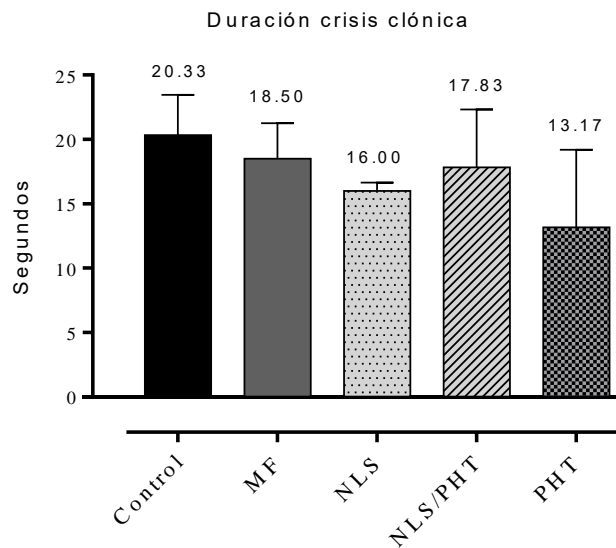


Figura 26. Tiempo de duración de crisis clónicas de cada grupo experimental.

Tabla 22. ANOVA para duración de crisis clónica por condición.

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Entre grupos	177,667	4	44,42	0,50	0,74
Intra grupos	2228,50	25	89,14		
Total (Corr.)	2406,17	29			

Tabla 23. Prueba de Múltiples Rangos para duración de crisis clónica por condición. (Método: 95.0 % Bonferroni).

<b>Condición</b>	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
PHT	6	13,17	X
NLS	6	16,00	X
NLS/PHT	6	17,83	X
Mezcla física	6	18,50	X
Control	6	20,33	X

### 7.3.3. Crisis tónico-clónica.

En lo que respecta a la incidencia del último tipo de crisis evaluado en este estudio (figura 27), la cual es la tónico-clónica, se encontraron resultados importantes.

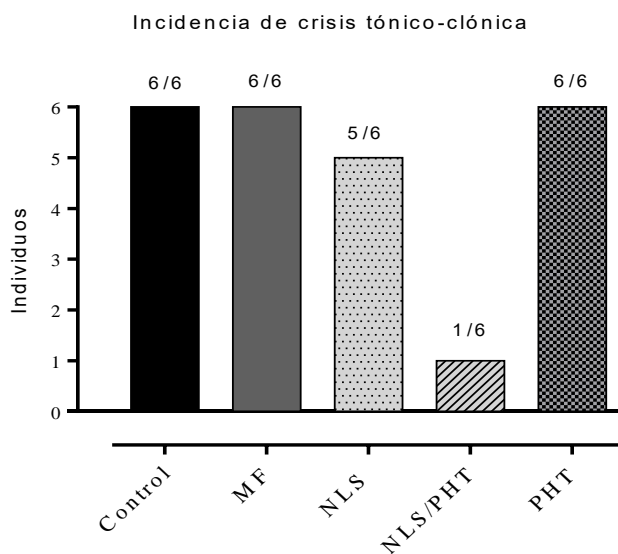


Figura 27. Incidencia de crisis tónico-clónica de cada grupo experimental.

Como se muestra en la figura 27, sólo un animal del grupo NLS/PHT presentó la crisis tónico-clónica mientras que en el grupo NLS 5 animales la presentaron, por otro lado, en los grupos control, mezcla física y PHT, la totalidad de los animales las experimentaron. Llevando a cabo la prueba chi cuadrada de Pearson para las tablas de contingencia (tablas 24 a 37) se encontró que existen diferencias estadísticamente significativas con un 95.0 % de confianza, entre las incidencias del grupo NLS/PHT con respecto a los demás grupos.

Tabla 24. Frecuencias para Condición/Incidencia crisis tónico-clónica. Control vs NLS.

	No presenta	Sí presenta	Total por Fila
Control	0	6	6
NLS	1	5	6
Total por Columna	1	11	12

Tabla 25. Prueba de independencia. Control vs NLS.

<i>Prueba</i>	<i>Estadístico</i>	<i>Gl</i>	<i>Valor-P</i>
Chi-Cuadrada	1,091	1	0,296

Tabla 26. Frecuencias para Condición/Incidencia crisis tónico-clónica. Control vs NLS/PHT.

	No presenta	Sí presenta	Total por Fila
<b>Control</b>	0	6	6
<b>NLS/PHT</b>	5	1	6
Total por Columna	5	7	12

Tabla 27. Prueba de independencia. Control vs NLS/PHT.

<i>Prueba</i>	<i>Estadístico</i>	<i>Gl</i>	<i>Valor-P</i>
Chi-Cuadrada	8,571	1	0,003

Tabla 28. Frecuencias para Condición/Incidencia crisis tónico-clónica. Mezcla física vs NLS.

	No presenta	Sí presenta	Total por Fila
<b>Mezcla física</b>	0	6	6
<b>NLS</b>	1	5	6
Total por Columna	1	11	12

Tabla 29. Prueba de independencia. Mezcla física vs NLS.

<i>Prueba</i>	<i>Estadístico</i>	<i>Gl</i>	<i>Valor-P</i>
Chi-Cuadrada	1,091	1	0,296

Tabla 30. Frecuencias para Condición/Incidencia crisis tónico-clónica. Mezcla física vs NLS/PHT.

	No presenta	Sí presenta	Total por Fila
<b>Mezcla física</b>	0	6	6
<b>NLS/PHT</b>	5	1	6
Total por Columna	5	7	12

Tabla 31. Prueba de independencia. Mezcla física vs NLS/PHT.

<i>Prueba</i>	<i>Estadístico</i>	<i>Gl</i>	<i>Valor-P</i>
Chi-Cuadrada	8,571	1	0,003

Tabla 32. Frecuencias para Condición/Incidencia crisis tónico-clónica. NLS/PHT vs NLS.

	No presenta	Sí presenta	Total por Fila
NLS/PHT	5	1	6
NLS	1	5	6
Total por Columna	6	6	12

Tabla 33. Prueba de independencia. NLS/PHT vs NLS.

Prueba	Estadístico	Gl	Valor-P
Chi-Cuadrada	5,333	1	0,021

Tabla 34. Frecuencias para Condición/Incidencia crisis tónico-clónica. NLS vs PHT.

	No presenta	Sí presenta	Total por Fila
NLS	1	5	6
PHT	0	6	6
Total por Columna	1	11	12

Tabla 35. Prueba de independencia. NLS vs PHT.

Prueba	Estadístico	Gl	Valor-P
Chi-Cuadrada	1,091	1	0,296

Tabla 36. Frecuencias para Condición/Incidencia crisis tónico-clónica. NLS/PHT vs PHT.

	No presenta	Sí presenta	Total por Fila
NLS/PHT	5	1	6
PHT	0	6	6
Total por Columna	5	7	12

Tabla 37. Prueba de independencia. NLS/PHT vs PHT.

Prueba	Estadístico	Gl	Valor-P
Chi-Cuadrada	8,571	1	0,003

Lo anterior implica que la incidencia de las crisis tónico-clónicas si está asociada al efecto producido por las NLS/PHT, es decir existe un marcado efecto anticonvulsivo sobre las crisis al emplear esta formulación. En tales casos, los valores de P fueron menores a 0.05. La incidencia de las crisis tónico-clónicas se redujo en más de la mitad con respecto a los demás grupos cuando se administraron las NLS/PHT y si se compara este resultado con el de la PHT sola se observa una mejor efectividad.

Los resultados del tiempo de latencia a este tipo de crisis se muestran en la figura 28. Se puede observar que las NLS/PHT tuvieron el mayor tiempo de latencia, con un valor de 1645.0 segundos y si se compara con el tiempo obtenido en el grupo control se observa que es cerca de más de 3 veces mayor. Sorpresivamente el grupo PHT fue quien mostró el menor tiempo con 274.3 segundos, incluso casi 4 veces menos que el tiempo de latencia para el grupo NLS. Después de realizar el correspondiente análisis de varianza (tablas 38 y 39) se encontró que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos PHT vs NLS, PHT vs NLS/PHT, NLS vs NLS/PHT, MF vs NLS/PHT y finalmente entre grupo control vs NLS/PHT con un 95.0 % de confianza. En los casos antes mencionados los valores de P fueron menores a 0.05.

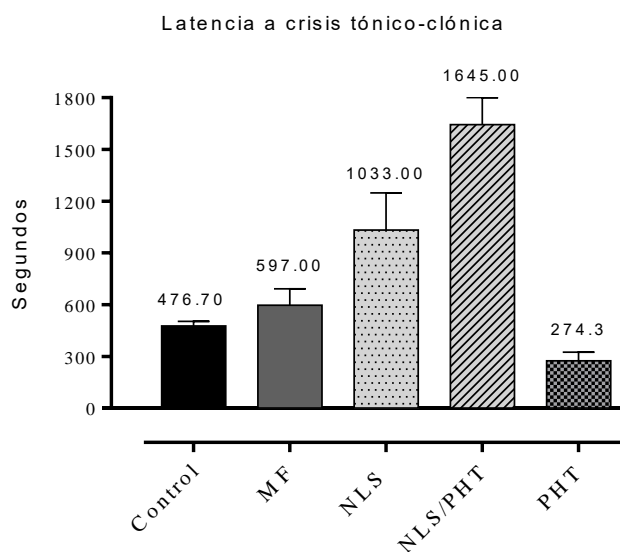


Figura 28. Tiempo de latencia de crisis tónico-clónica de cada grupo experimental.

Tabla 38. ANOVA para latencia a crisis tónico-clónica por condición.

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Entre grupos	7,14E6	4	1,79E6	17,94	0,00
Intra grupos	2,49E6	25	99494,60		
Total (Corr.)	9,63E6	29			

Tabla 39. Prueba de Múltiples Rangos para latencia a crisis tónico-clónica por condición. (Metodo: 95.9 % Bonferroni).

<b>Condición</b>	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
PHT	6	274,33	X
Control	6	476,67	XX
Mezcla física	6	597,00	XX
NLS	6	1033,17	X
NLS/PHT	6	1644,67	X

Es importante resaltar que en este caso también la formulación de NLS por si sola fue capaz de retrasar la aparición de las crisis clónicas significativamente con respecto a la PHT mostrando un efecto anticonvulsivo aunque no se encuentre el fármaco presente. Si comparamos la latencia de las NLS/PHT con respecto a la PHT se observa que es prácticamente 6 veces mayor. Lo anteriormente expuesto implica que tanto las NLS/PHT como las NLS muestran un efecto anticonvulsivo estadísticamente significativo con respecto al tiempo en que se presentan las crisis tónico-clónicas. Esto cobra relevancia porque se trata del tipo de crisis de mayor severidad dentro de las crisis convulsivas características de la epilepsia superando incluso al efecto producido cuando se administra sólo la PHT.

En cuanto al tiempo que duran las crisis tónico-clónicas (figura 29), en el grupo NLS/PHT se observó la menor duración con 2.83 segundos.



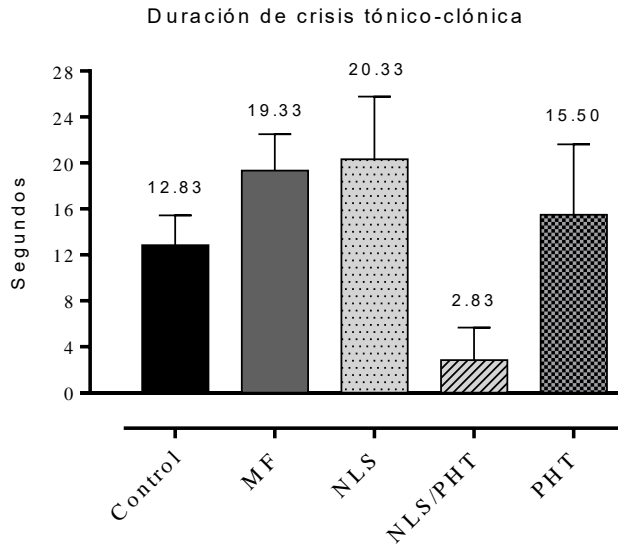


Figura 29. Tiempo de duración de crisis tónico-clónica de cada grupo experimental.

El análisis de varianza efectuado para este caso mostrado en las tablas 40 y 41, arrojó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de experimentación con un 95 % de confianza en la duración, en el que el tiempo del grupo NLS/PHT se redujo en poco más de 5 veces con respecto al tiempo del grupo PHT y en poco más de 7 veces si se compara contra el tiempo obtenido en el grupo NLS que fue quien mostró la mayor duración con 20.33 segundos.

Tabla 40. ANOVA para duración de crisis tónico-clónica por condición.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	1180,33	4	295,08	2,67	0,06
Intra grupos	2767,83	25	110,71		
Total (Corr.)	3948,17	29			

Tabla 41. Prueba de Múltiples Rangos para duración de crisis tónico-clónica por condición. (Método: 95.0 % Bonferroni).

<i>Condición</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
NLS/PHT	6	2,83	X
Control	6	12,83	X
PHT	6	15,50	X
Mezcla física	6	19,33	X
NLS	6	20,33	X

Una vez más dejando un poco de lado la significancia estadística, ya que el valor de P fue de 0.06, las NLS/PHT redujeron la duración de las crisis clónicas con respecto a los demás grupos de estudio en las proporciones antes mencionadas.

#### 7.3.4. Muerte.

A la dosis que el PTZ fue utilizado es muy probable que los animales mueran como consecuencia de la severidad de las crisis que estos experimentan causada por la potente actividad convulsivante de este fármaco. En la mayoría de los casos, el fenómeno se presentó casi inmediatamente después de terminadas las crisis tónico-clónicas, lo cual también se verificó electrográficamente. La incidencia del evento se muestra en la figura 30.

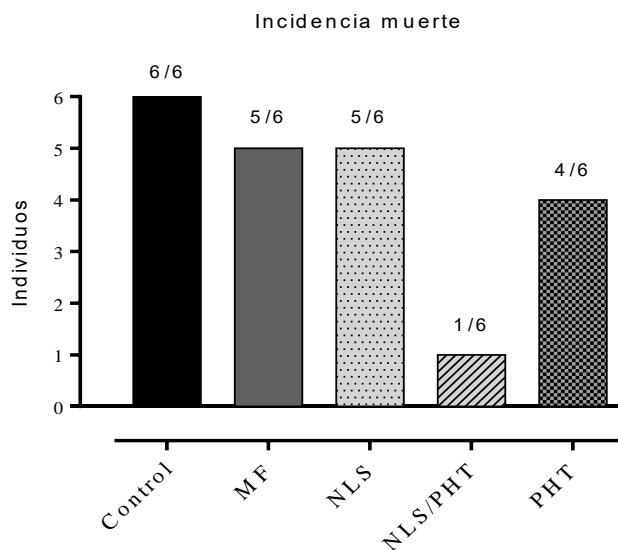


Figura 30. Incidencia de muerte de cada grupo experimental.

Es posible observar que sólo uno de los animales del grupo NLS/PHT muere y si esto lo correlacionamos con los resultados de incidencia de crisis tónico clónica para este mismo grupo, se puede notar que el único animal que experimentó este tipo de crisis perdió la vida una vez que esta terminó, lo anterior implica que las NLS/PHT son capaces de brindar cierto

efecto protector evitando que las descargas epilépticas de alto voltaje se propaguen a través de la corteza cerebral disminuyendo la incidencia de las crisis tónico clínicas y consecuentemente la muerte de los animales en este caso.

En las tablas de contingencia correspondientes a este evento (tablas 42 a 61) queda de manifiesto que, en los casos donde existe significancia estadística (Control vs NLS/PHT; Mezcla física vs NLS/PHT; NLS vs NLS/PHT), la incidencia de la muerte esta asociada al efecto de las NLS/PHT con 95.0 % de confianza.

Tabla 42. Frecuencias para Condición/Incidencia muerte. Control vs Mezcla física.

	No presenta	Sí presenta	Total por Fila
<b>Control</b>	0	6	6
<b>Mezcla física</b>	1	5	6
Total por Columna	1	11	12

Tabla 43. Prueba de independencia. Control vs Mezcla física.

<i>Prueba</i>	<i>Estadístico</i>	<i>Gl</i>	<i>Valor-P</i>
Chi-Cuadrada	1,091	1	0,296

Tabla 44. Frecuencias para Condición/Incidencia muerte. Control vs NLS.

	No presenta	Sí presenta	Total por Fila
<b>Control</b>	0	6	6
<b>NLS</b>	1	5	6
Total por Columna	1	11	12

Tabla 45. Prueba de independencia. Control vs NLS.

<i>Prueba</i>	<i>Estadístico</i>	<i>Gl</i>	<i>Valor-P</i>
Chi-Cuadrada	1,091	1	0,296

Tabla 46. Frecuencias para Condición/Incidencia muerte. Control vs NLS/PHT.

	No presenta	Sí presenta	Total por Fila
<b>Control</b>	0	6	6
<b>NLS/PHT</b>	5	1	6
Total por Columna	5	7	12

Tabla 47. Prueba de independencia. Control vs NLS/PHT.

<i>Prueba</i>	<i>Estadístico</i>	<i>Gl</i>	<i>Valor-P</i>
Chi-Cuadrada	8,571	1	0,003

Tabla 48. Frecuencias para Condición/Incidencia muerte. Control vs PHT.

	No presenta	Sí presenta	Total por Fila
<b>Control</b>	0	6	6
<b>PHT</b>	2	4	6
Total por Columna	2	10	12

Tabla 49. Prueba de independencia. Control vs PHT.

<i>Prueba</i>	<i>Estadístico</i>	<i>Gl</i>	<i>Valor-P</i>
Chi-Cuadrada	2,400	1	0,121

Tabla 50. Frecuencias para Condición/Incidencia muerte. Mezcla física vs NLS.

	No presenta	Sí presenta	Total por Fila
<b>Mezcla física</b>	1	5	6
<b>NLS</b>	1	5	6
Total por Columna	2	10	12

Tabla 51. Prueba de independencia. Mezcla física vs NLS.

<i>Prueba</i>	<i>Estadístico</i>	<i>Gl</i>	<i>Valor-P</i>
Chi-Cuadrada	0,000	1	1,000

Tabla 52. Frecuencias para Condición/Incidencia muerte. Mezcla física vs NLS/PHT.

	No presenta	Sí presenta	Total por Fila
<b>Mezcla física</b>	1	5	6
<b>NLS/PHT</b>	5	1	6
Total por Columna	6	6	12

Tabla 53. Prueba de independencia. Mezcla física vs NLS/PHT.

<i>Prueba</i>	<i>Estadístico</i>	<i>Gl</i>	<i>Valor-P</i>
Chi-Cuadrada	5,333	1	0,021

Tabla 54. Frecuencias para Condición/Incidencia muerte. Mezcla física vs PHT.

	No presenta	Sí presenta	Total por Fila
<b>Mezcla física</b>	1	5	6
<b>PHT</b>	2	4	6
Total por Columna	3	9	12

Tabla 55. Prueba de independencia. Mezcla física vs PHT.

<i>Prueba</i>	<i>Estadístico</i>	<i>Gl</i>	<i>Valor-P</i>
Chi-Cuadrada	0,444	1	0,505

Tabla 56. Frecuencias para Condición/Incidencia muerte. NLS/PHT vs NLS.

	No presenta	Sí presenta	Total por Fila
<b>NLS/ PHT</b>	5	1	6
<b>NLS</b>	1	5	6
Total por Columna	6	6	12

Tabla 57. Prueba de independencia. NLS/PHT vs NLS.

<i>Prueba</i>	<i>Estadístico</i>	<i>Gl</i>	<i>Valor-P</i>
Chi-Cuadrada	5,333	1	0,021

Tabla 58. Frecuencias para Condición/Incidencia muerte. NLS vs PHT.

	No presenta	Sí presenta	Total por Fila
<b>NLS</b>	1	5	6
<b>PHT</b>	2	4	6
Total por Columna	3	9	12

Tabla 59. Prueba de independencia. NLS vs PHT.

<i>Prueba</i>	<i>Estadístico</i>	<i>Gl</i>	<i>Valor-P</i>
Chi-Cuadrada	0,444	1	0,505

Tabla 60. Frecuencias para Condición/Incidencia muerte. NLS/PHT vs PHT.

	No presenta	Sí presenta	Total por Fila
NLS/PHT	5	1	6
PHT	2	4	6
Total por Columna	7	5	12

Tabla 61. Prueba de independencia. NLS/PHT vs PHT.

Prueba	Estadístico	Gl	Valor-P
Chi-Cuadrada	3,086	1	0,079

Se sabe que la fenitoína actúa sobre los canales de sodio dependientes de voltaje propiciando su bloqueo y por lo tanto modifica su funcionamiento como uno de los moduladores que rigen el comportamiento de los sistemas excitatorios e inhibitorios en la red neuronal que conforma el sistema nervioso central (Patocka et al., 2020). Se ha demostrado también que el receptor al cual se une la fenitoína se sitúa dentro del canal mismo, y a su vez, estos canales se pueden encontrar en alguno de tres estados posibles; cerrado, abierto e inactivo (Mantegazza et al., 2010). El estado en que se encuentre dicho canal es el que regula el grado de afinidad que tendrá el receptor por el fármaco siendo el estado inactivo el que mayor afinidad exhibe. Creemos que la formulación presenta un marcado efecto anticonvulsivo sobre las crisis tónico-clónicas, que como ya se mencionó, son el tipo más severo de crisis epilépticas obtenidas con el modelo de estudio utilizado, en el que la hiperpolarización de la membrana celular es mayor, porque de alguna manera estamos modificando el grado en que la fenitoína se une a su receptor en el estado inactivo del canal al estar formando parte de un sistema nanoparticulado con el que evidentemente por lo resultados encontrados, se logra disminuir tanto la incidencia del evento así como la latencia del mismo. La disminución de la incidencia de la muerte también refuerza nuestro argumento sobre este posible mecanismo de acción de la formulación en estudio.

## 8. Conclusiones.

Se fabricaron nanopartículas lipídicas sólidas a base de ácido esteárico cargadas con el fármaco anticonvulsivo fenitoína por medio del método de emulsificación en caliente obteniéndose tamaños de partícula del orden de los 388.6 nm, con un índice de polidispersión de 0.107 y un potencial Z de -33.4 mV.

Se caracterizó el efecto anticonvulsivo provocado por las nanopartículas lipídicas sólidas con fármaco y sin él, en un modelo crónico para epilepsia (PTZ) donde se evaluaron las modificaciones inducidas en las distintas etapas de las crisis convulsivas propias de la enfermedad, encontrando diferencias significativas en algunos casos.

Para la evaluación de efecto anticonvulsivo, se usó la técnica de electroencefalografía, caracterizando la morfología de las señales que se asocian a los distintos tipos de crisis epilépticas para la determinación de los tiempos de latencia y su duración evidenciando su gran utilidad en el estudio de los cambios electrográficos asociados a tales crisis. También se lograron diferenciar y caracterizar las señales EEG de los animales en estado basal, cuando se administraron los tratamientos y cuando se administró el PTZ.

A pesar de la baja cantidad de fármaco en las nanopartículas, se encontraron diferencias en cuanto al efecto producido en las crisis tónico-clónicas en comparación con la administración la fenitoína sin el nanotransportador.

Ninguno de los tratamientos aplicados tuvo efecto sobre la incidencia de los *neck jerks* ni en el tiempo de latencia de aparición de éstos. Tampoco mostraron diferencias significativas en la incidencia, latencia y duración de las crisis clónicas.

Las NLS/PHT modificaron la incidencia y la latencia de las crisis tónico-clónicas provocando que menos animales las experimentaran y cuando estas se presentaron, se logró retrasar su aparición. Así mismo, no mostraron efecto significativo alguno sobre la duración de estas crisis.

Las NLS sin fármaco, también retrasaron significativamente las crisis tónico-clónicas con respecto a la latencia mostrada cuando se administró sólo la fenitoína.

La tasa de mortalidad de los animales se redujo como consecuencia de la administración de las NLS/PHT por lo que se puede decir que sí tienen un efecto protector evitando la incidencia del fenómeno.

El tamaño nanométrico influye en el efecto de los nanotransportadores ya que la mezcla física por sí sola no presenta actividad anticonvulsiva.



## 9. Perspectivas.

Realizar pruebas *in vitro*, y de ser posible *in vivo*, de la cinética de liberación de la PHT en los nanotransportadores formulados.

Utilizar otro tipo de lípidos de origen natural o excipientes basados en lípidos que permitan incorporar una mayor cantidad de fármaco en los sistemas y evaluar su potencial efecto anticonvulsivo.

Implementar un estudio que permita evaluar más a fondo el mecanismo por el cual las NLS sin fármaco presentan un efecto anticonvulsivo.

Formular los mismos nanotransportadores pero utilizando diferentes tipos de fármacos utilizados en distintos trastornos neurológicos.

Llevar a cabo estudios de toxicidad y estabilidad a largo plazo que ratifiquen la seguridad de su uso.

Analizar la viabilidad del escalamiento del proceso de fabricación a nivel industrial con miras a un posible desarrollo comercial.

Utilizar otro tipo de modelos de epilepsia que complementen los resultados obtenidos en el presente estudio.

## 10. REFERENCIAS.

Abbot N., Rönnbäck L., Hansson E., (2006) Astrocyte-endothelial interactions and the blood-brain barrier. *Nature Review Neuroscience*, 7, 41-53.

Allam M., Beg S., Samad A., Babbota S., Kohli K., Ali J., Ahuja A., Akbar M., (2010) Strategy for effective brain drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Science*, 40, 385-403.

Ana R., Mendes M., Sousa J., Pais A., Falcão A., Fortuna A., Vitorino C., (2019) Rethinking carbamazepine oral delivery using polymer-lipid hybrid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 554, 352-365.

Annop V., Cutinho L., Mourya P., Maxwell A., Thomas G., Singh B., (2020) Approaches for encephalic drug delivery using nanomaterials: The current status. *Brain Research Bulletin*, 155, 184-190.

Aydin S., Yildirim M., Abidin I., Akca M., Cansu A., (2011) Comparison of focally induced epileptiform activities in C57BL/6 and BALB/c mice by using *in vivo* EEG recording. *Neuroscience Letters*, 504, 165-169.

Badens E., MAsmoudi Y., Mouahid A., Crampon C., (2018) Current situation and perspectives in drug formulation by using supercritical fluid technology. *The Journal of Supercritical Fluids*, 134, 271-283.

Bai D., Zhu G., Pennefather P., Jackson M., MacDonald J., Orsen B., (2001) Distinct functional and pharmacological properties of tonic and quantal inhibitory post-synaptic currents mediated by gamma-aminobutyric Acid (A) receptors in hippocampal neurons. *Molecular Pharmacology*, 59, 814-824.

Bankstahl M., Klein S., Römermann K., Löscher W., (2016) Knockout of P-glycoprotein does not alter antiepileptic drug efficacy in the intrahippocampal kainate model of mesial temporal lobe epilepsy in mice. *Neuropharmacology*, 109, 183-195.

Barbu E., Molnar E., Tsibouklis J., Górecki D., (2009) The potential of nanoparticles-based drug delivery to the brain: overcoming the blood-brain barrier. *Expert Opinion Drug Delivery*, 6, 553-565.

Barnabas W., Lavanya Y., Priyadarshini S., Ramasamy M., Leno J., (2014) Albumin nanoparticles for the delivery of gabapentine: Preparation, characterization and pharmacodynamic studies. *International Journal of Pharmaceutics*, 473, 73-79.

Basulto J., Comas M., Manera M., Baladia E., (2009) Ácido esteárico y salud cardiovascular. *Actividad Dietética*, 13, (4), 161-172.

Battaglia L., Gallarte M., (2012) Lipid nanoparticles: state of the art, new preparation methods and challenges in drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 9, 497-508.

Beloqui A., Solinís M., Rodríguez A., Almeida A., Préat V., (2016) Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery system for future clinics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 12, 143-161.

Berg A., Berkovic S., Brodie M., (2010) Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*, 51, 676-685.

Bertram E., (2013) Neuronal circuits in epilepsy: Do they matter? *Experimental Neurology*, 244, 67-74.

Bezerra T., Loureiro L., Carvalho A., Oliveira M., Dias R., Sarmiento B., Lúcio M., (2018) Lipid nanocarriers loaded with natural compounds: Potential new therapies for age related neurodegenerative diseases? *Progress in Neurobiology*, 168, 21-41.

Bialer M., White H., (2010) Key factors in the discovery and development of new anti-epileptic drugs. *Nature Reviews, Drug Discovery*, 9, 68-82.

Blasi P., Giovagnoli S., Schoubben A., Ricci M., Rossi C., (2007) Solid lipid nanoparticles for targeted brain drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 454-477.

Blasiucci A., Franceschiello B., Murray M., (2019) Electroencephalography. *Current Biology*, 29, R80-R85.

Campani V., Giarra s., De Rosa G., (2018) Lipid-based core-shell nanoparticles: Evolution and potentialities in drug delivery. *OpenNano*, 3, 5-17.

Cheng H., Wang Y., Chen J., Chen Z., (2020) The piriform cortex in epilepsy: What we learn from the kindling model. *Experimental Neurology*, 324, 113137.

Ciftci O., Temelli F., (2016) Formation of solid lipid microparticles from fully hydrogenated canola oil using supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering*, 178, 137-144.

Coorg R., Weisenberg J., Wong M., (2013) Clinical Neurogenetics: recent advances in the genetics of epilepsy. *Neurologic Clinics*, 131, 891-913.

Coperland C., Stabenfeldt S., (2020) Leveraging the dynamic blood-brain barrier for central nervous system nanoparticle-based drug delivery applications. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 14, 1-8.

Coulter D., Huguenard J., Prince D., (1989) Characterization of ethosuximide reduction of low-threshold calcium current in thalamic neurons. *Annals of Neurology*, 25, 582-593.

Covo P., (2006) John Hughlings Jackson, un científico victoriano. *Acta Neurológica Colombiana*, 22, 275-260.

Crouch B., Yeap J., Pais B., Riedel G., Platt B., (2019) Of mice and motion: Behavioural-EEG phenotyping of Alzheimer's disease mouse models. *Journal of Neuroscience Methods*, 319, 89-98.

Etholm L., Arabadzisz D., Lipp H., Heggelund P., (2010) Seizure logging: A new approach to synchronized cable-free EEG and video recording of seizure activity in mice. *Journal of Neuroscience Methods*, 192, 254-260.

Eugenin E., Clements J., Zink M., Berman J., (2011) HIV infection of human astrocytes disrupts blood brain barrier integrity by a gap junction dependent mechanism. *Journal of Neuroscience*, 31, 9456-9465.

Fang Z., Chen S., Qin J., Chen B., Ni G., Chen Z., Zhou J., Li Z., Ning Y., Wu C., Zhou L., (2016) Pluronic P85-coated poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles overcome phenytoin resistance in P-glycoprotein overexpressing rats with lithium-pilocarpine-induced chronic temporal lobe epilepsy. *Biomaterials*, 97, 100-121.

Ferraris C., Cavalli R., Panciani P., Battaglia L., (2020) Overcoming the blood-brain barrier: Successes and challenges in developing nanoparticle-mediated drug delivery systems for the treatment of brain tumors. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 2999-3022.

Ferro M., Heilshorn S., Owens R., (2020) Materials for blood brain barrier modeling *in vitro*. *Materials Science & Engineering R*, 140, 100522.

Figueroa A., (2010) Estudio clínico, epidemiológico y sociocultural de la epilepsia, un enfoque crítico. Archivos de Neurociencias, 15, (3), 139-151.

Figueroa A., Campbell O., (2004) Aspectos psicosociales de la epilepsia. Archivos de Neurociencias, 9, (3), 135-142.

Figueroa A., Campbell O., (2015) La visión de la epilepsia a través de la historia. Boletín Clínico Hospital Infantil del Estado de Sonora, 32, (2), 87-101.

Fisher R., (1989) Animal models of the epilepsies. Brain Research, 14, 245-278.

Fisher R., Boas W., Blume W., Elger C., Genton P., Lee P., Engel J., (2005) Epileptic seizures and epilepsy: Definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). Epilepsia, 46, (4), 470-472.

Foerter-Barth U., Teipel U., (2000) Characterization of particles by means of laser light diffraction and dynamic light scattering. Developments in Mineral Processing, 13, C1-1-C1-8.

Fredrick E., Walstra P., Dewettinck K., (2010) Factors governing partial coalescence in oil-in-water emulsions. Advances in Colloid and Interface Science, 153, 30-42.

Freitas C., Müller R., (1998) Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticles (SLN) dispersion. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 168, 221-129.

French J., Krauss G., Biton V., Squillacote D., Yang H., Laurenza A., Rogawski M., (2012) Adjunctive perampanel for refractory partial-onset seizures: Randomized phase III study 304. Neurology, 79, 589-596.

Fu Y., Li L., Wang Y., Chu G., Kong X., Wang J., (2019) Role of GABA<sub>A</sub> receptors in EEG activity and spatial recognition memory in aged APP and PS1 double transgenic mice. *Neurochemistry International*, 131, 104542.

Gadelha E., Marquez A., Paese K., Coradini K., Vasconcelos C., Raffin A., Schneider M., Stanisçuaski S., Ruver R., (2018) Reconstituted spray-dried phenytoin-loaded nanocapsules improve the *in vivo* phenytoin anticonvulsant effect and the survival time in mice. *International Journal of Pharmaceutics*, 551, 121-132.

Gastaldi L., Battaglia L., Peira E., Chirro D., Muntoni E., Solazzi I., Gallarte M., Dosio F., (2014) Solid lipid nanoparticles as vehicles of drug to the brain: current state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 87, 433-444.

González M., Domínguez F., Pérez G., Aguillón M., Martínez D., Almazán S., Martínez a., (2017) *Justicia spicigera* Schltdl. and kaempferitrin as potential anticonvulsant natural products. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 92, 240-248.

Göppert T., Müller R., (2003) Plasma protein adsorption of Tween 80 and Poloxamer-188 stabilized solid lipid nanoparticles. *Journal of Drug Targeting*, 11, 225-231.

Grone B., Baraban S., (2015) Animal models in epilepsy research: Legacies and new directions. *Nature Neuroscience*, 18, 339-343.

Gryder D., Rogawski M., (2003) Selective antagonism of GluR5 kainate-receptor-mediated synaptic currents by topiramate in rat basolateral amygdala neurons. *The Journal of Neuroscience*, 23, 7069-7074.

Habibullah H., (2020) 30 years of atomic force microscopy: creep, hysteresis, cross-coupling and vibration problems of piezoelectric tube scanners. *Measurement*, 159, 107776.

Hackethal V., (2017) Anticonvulsant Potiga Discontinued in June 2017, *NeurologyLive*

Hagner M., (2012) The electrical excitability of the brain: toward the emergence of an experiment. *Journal of the history of the neurosciences*, 21, (3), 237-249.

Harilal S., Jose J., Thomas D., Kumar R., Kesavan M., Uddin S., Mathews G., Pratap R., Marathakam A., Mathew B., (2020) Revisiting the blood-brain barrier: A hard nut to crack in the transportation of drug molecules. *Brain Research Bulletin*, 160, 121-140.

Hashemian M., Anissian D., Ghasemi mM., Akbari A., Khalili M., Ghasemi S., Ahmadi F., Akbar A., Ebrahimpour A., (2017) Curcumin-loaded chitosan-alginate-STPP nanoparticles ameliorate memory deficits and reduce glial activation in pentylenetetrazole.induced kindling model of epilepsys. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*, 79, 462-471.

He H., Yao J., Zhang Y., Chen Y., Wang K., Lee R., Yu B., Zhang X., (2019) Solid lipid nanoparticles as drug delivery system to across the blood-brain barrier. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 519, 385-390.

Hogan R., English E., (2012) Epilepsy and brain function: common ideas of Hughlings-Jackson and Wilder Penfield. *Epilepsy & Behavior*, 24, 311-313.

Howard P., Twycross R., Shuster J., Mihalyo M., Rémi J., Wilcock A., (2011) Anti-epileptic Drugs. *Journal of Pain and Symptom Management*, 42, (5), 788-804.

Jog R., Burgess D., (2017) Pharmaceutical Amorphous Nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Science*, 106, 39-65.

Kathe N., Henriksen B., Chauhan H., (2014) Physicochemical characterization techniques for solid lipid nanoparticles: principles and limitations. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 40, (12), 1565-1575.



Keppel J., Kopsky D., (2017) Phenytoin: 80 years young, from epilepsy to breast cancer, a remarkable molecule with multiple modes of action. *Journal of Neurology*, 264, 1617-1621.

Khan A., Yang X., Fu M., Zhai G., (2018) Recent progress of drug nanoformulations targeting to brain. *Journal of Controlled Release*, 291, 37-64.

Kohling R., Wolfart J., (2016) Potassium channels in epilepsy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6.

Korczyński A., Schachter S., Amlerová J., Bialer M., Emde W., Brázdil M., Rektor I., (2015) Third International Congress on Epilepsy, Brain and Mind: Part 1, *Epilepsy & Behavior*.

Kupetz E., Bunjes H., (2014) Lipid nanoparticles: drug localization is substance-specific and achievable load depends on the size and physical state of the particles. *Journal of Controlled Release*, 189, 54-64.

Kwan P., Arzimanoglou A., Berg A., Brodie M., Allen Hauser W., Mathern G., (2010) Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*, 51, 1069-1077.

Li Y., Wu H., Zhang R., Shu G., Wang S., Gao P., Zhu X., Jiang Q., Wang L., (2020) Diet containing stearic acid increases food reward-related behaviors in mice compared with oleic acid. *Brain Research Bulletin*, 164, 45-54.

Lippacher A., Müller R., Mäder K., (2004) Liquid and semisolid SLN dispersions for topical application: rheological characterization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58, 561-567.

Loch G., Koepp J., (2010) The blood brain barrier and drug delivery in the central nervous system. *Revista de Neurología*, 51, 165-174.

Long Q., Li J., Luo Q., Hei Y., Wang K., Tian Y., Yang J., Lei H., Qiu B., Liu W., (2015) MRI tracking of bone marrow mesenchymal stem cells labeled with ultr-small superparamagnetic iron oxide nanoparticles in rat model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience Letters*, 606, 30-35.

Lopes da Silva F., (2013) EEG and MEG: Relevance to Neuroscience. *Neuron*, 80, 1112-1128.

López J., Ortiz E., Meza D., Basaldella E., Bokhimi X., Magaña C., Sepúlveda A., Rodríguez f., Ruiz J., (2011) Controlled release of phenytoin for epilepsy treatment from titania and silica based materials. *Materials Chemistry and Physics*, 126, 922-929.

López T., Quintana P., Ortiz e., Vinogradova E., Manjarrez J., Aguilar D., Castillo P., Magaña C., Azamar J., (2007) Characterization of sodium phenytoin co-gelled with titania for a controlled drug-release system. *Materials Characterization*, 58, 823-828.

Loup F., Wieser H., Yonekawa Y., Aguzzi A., Fritschy J., (2000) Selective alterations in GABA<sub>A</sub> receptors subtypes in human temporal lobe epilepsy. *The journal of Neuroscience*, 20, 5401-5419.

Luissint A., Artus C., Glacial F., Ganeshamoorthy K., Conraud P., (2012) Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation. *Fluids and Barriers of the CNS*, 9, 23-34.

Luo Y., Yang H., Zhou Y., Hu B., (2020) Dual and multi-targeted nanoparticles for site-specific brain delivery. *Journal of Controlled Release*, 317, 195-215.

Mansoor S., Hashemian M., Khalili M., Ashrafpour M., Moghadamnia A., Ghasemi M., (2018) Upregulation of klotho and erythropoietin contributes to the neuroprotection induced by curcumin-loaded nanoparticles in experimental model of chronic epilepsy. *Brain Research Bulletin*, 142, 281-288.

Mantegazza M., Curia G., Biagini G., Ragsdale D., Avoli M., (2010) Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets in epilepsy and other neurological disorders. *Lancet Neurology*, 9, 413-424.

Marosi E., (2012) *Electroencefalografía de la A a la Z*. Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Mazzone G., Nistri A., (2019) Modulation of extrasynaptic GABAergic receptor activity influences glutamate release and neuronal survival following excitotoxic damage to mouse spinal cord neurons. *Neurochemistry International*, 128, 175-185.

Meenu M., Reeta K., Kumar A., Kumar S., Kumar Y., (2019) Evaluation of sodium valproate loaded nanoparticles in acute and chronic pentylenetetrazole induced seizure models. *Epilepsy Research*, 158, 106219.

Mikitsh J., Chako A., (2014) Pathways for small molecule delivery to the central nervous system across the blood-brain barrier. *Perspectives in Medicinal Chemistry*, 6, 11-24.

Mishra D., Shandilya R., Mishra P., (2018) Lipid based nanocarriers: a translational perspective. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 14, (7), 2023-2050.

Moghimi S., Porter C., Muir I., Illum L., David S., (1991) Non-phagocytic uptake of intravenously injected microspheres in rat spleen: influence of particle size and hydrophilic coating. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 177, 861-866.

Moghini S., Hunter A., Murray J., (2001) Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacological Reviews*, 53, 283-318.

Monteyne T., Adriaensens P., Brouckaert D., Remon J., Vervaet C., De Beer T., (2016) Stearic acid and high molecular weight PEO as matrix for the highly water-soluble metoprolol tartrate

in continuous twin-screw melt granulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 512, 158-167.

Montoto S., Sbaraglini M., Talevi A., Couyoupetrou M., Di Ianni M., Pesce G., Alvarez G., Bruno-Blanch L., Castro G., Ruiz M., Islan G., (2018) Carbamazepine-loaded solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: Physicochemical characterization and *in vitro/in vivo* evaluation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 167, 73-81.

Müller R., Karsten mäder K., Gohla S., (2000) Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50, 161-177.

Müller R., Shegokar R., Keck C., (2011) 20 years of lipid nanoparticles (SLNs and NLC): present state of development and industrial applications. *Current Drug Discovery Technologies*, 8, 207-227.

Musumeci T., Serapide M., Pellitteri R., Dalpiaz A., Ferraro L., Dal Magro R., Bonaccorso A., Carbone C., Veiga F., Sancini G., Puglisi G., (2018) Oxcarbazepine free or loaded PLGA nanoparticles as effective intranasal approach to control epileptic seizures in rodents. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 133, 309-320.

Nagib M., Tadros M., Al-khalek H., Rahmo R., Sabri N., Khalifa A., Masoud S., (2018) Molecular mechanisms of neuroprotective effect of adjuvant therapy with phenytoin in pentylenetetrazole-induced seizures: Impact on Sirt1/NRF2 signaling pathways. *Neurotoxicology*, 68, 47-65.

Naseri N., Valizaden H., Zakeri P., (2015) Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: structure, preparation and application. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 3, 305-313.

Negi J., Chattopadhyay P., Sharma A., Ram V., (2013) Development of solid lipid nanoparticles (SNLs) of lopinavir using hot self nano-emulsification (SNE) technique. *European Journal of pharmaceutical sciences*, 48, 231-239.

Oyrer J., Maljevic S., Scheffer I., Berkovic S., Petiou S., Reid C., (2018) Ion channels in genetic epilepsy: from genes and mechanisms to disease-targeted therapies. *Pharmacological Reviews*, 70, 142-173.

Pardridge W., (2001) Crossing the blood-brain barrier: are we getting it right? *Drug discovery Today*, 6, 1-2.

Pardridge W., (2003) Blood-brain barrier drug targeting: the future of brain drug development. *Molecular Interventions*, 3, (2), 90-105.

Patel T., Zhou J., Piepmeier J., Saltzman W., (2012) Polymeric nanoparticles for drug delivery to the central nervous system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 701-705.

Patocka J., Wu Q., Nepovimova E., Kuca K., (2020) Phenytoin – An antiseizure drug: Overview of its chemistry, pharmacology and toxicology. *Food and Chemical Toxicology*, 20, 30281-30287.

Paxinos G., Franklin K., (2001) Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates.

Perucca P., Dubeau F., Gotman J., (2014) Intracranial electroencephalographic seizure-onset patterns: effect of underlying pathology. *Brain*, 137, 183-196.

Polanco L., Vargas C., Góngora M., (2011) Modelos animales: una revisión desde tres pruebas utilizadas para ansiedad. *Suma Psicológica*, 18, (2), 141-148.

Poole E., McGavin J., Cochkanoff N., Crosby K., (2019) Stereotaxic surgery for implantation of guide cannulas for microinjection into the dorsomedial hypothalamus in young rats. *MethodsX*, 6, 1652-1659.

Ragsdale D., Avoli M., (1998) Sodium channels as molecular targets for antiepileptic drugs. *Brain Research Reviews*, 26, 16-28.

Ramos F., Correa J., Saavedra M., Acosta M., Gasca E., Pérez A., Trujillo J., (2012) Modelo PTZ: un screening primario para el desarrollo de nuevas moléculas con actividad anticonvulsivante. *Archivos de Neurociencias*, 17, 45-48.

Ren T., Hu M., Cheng Y., Lam T., Xiao M., James N., Zhang C., Yee S., Zuo Z., (2019) Piperine-loaded nanoparticles with enhanced dissolution and oral bioavailability for epilepsy control. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 137, 104988.

Rho J., Donevan S., Rogawski M., (1994) Mechanism of action of the anticonvulsant felbamate: Opposing effects on N-methyl-D-aspartate and gamma-aminobutyric acid A receptors. *Annals of Neurology*, 35, 229-234.

Ribbico M., Sodja C., Haukenfrers J., Haqqani A., Ly D., Zachar P., Baumann E., Ball M., Huang J., Rukhlova M., Martina M., Liu Q., Stanimirovic D., Jezierski A., Bani M., (2018) A novel human induced pluripotent stem cell blood-brain barrier model: applicability to study antibody-triggered receptor-mediated transcytosis. *Scientific Reports*, 8, (1), 1873.

Ricci M., Blasi P., Giovagnoli S., Rossi C., (2006) Delivering drugs to the central nervous system: a medicinal chemistry or a pharmaceutical technology issue? *Current Medical Chemistry*, 13, 1757-1775.

Rishitha N., Muthuraman A., (2018) Therapeutic evaluation of solid lipid nanoparticle of quercetin in pentylenetetrazole induced cognitive impairment of zebrafish. *Life Sciences*, 199, 80-87.

Rocha L., (2005) La enfermedad que alguna vez fue sagrada. *Ciencia*, 6-13.

Roet M., Heschem S., Jahanshahi A., Rutten B., Anikeeva P., Temel Y., (2019) Progress in neuromodulation of the brain: A role for magnetic nanoparticles? *Progress in Neurobiology*, 177, 1-14.

Rogawski M., Loscher W., (2004) The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nature Review, Neuroscience*, 5, 553-564.

Sanchez B., Lee J., Strimaite M., Buanz A., Bailey R., Gershkovich P., Pasparakis G., Williams G., (2019) Solid lipid nanoparticles self-assembled from spray dried microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 572, 118784.

Sandoval K., Witt K., (2008) Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiology of disease*, 32 (2), 200-219.

Sarkisian M., (2001) Overview of the current animal models for human seizures and epileptic disorders. *Epilepsy & Behavior*, 216, (2), 201-216.

Schenzer A., Friedrich T., Pusch M., Saftig P., Jentsch T., Grotzinger J., Schwake M., (2005) Molecular determinants of KCNQ (kv7) channel sensitivity to the anticonvulsant retigabine. *The Journal of Neuroscience*, 25, 5051-5060.

Shah C., Shan V., Upadhyay U., (2011) Solid lipid nanoparticles: a review current. *Pharmaceutical Research*, 1, (4), 351-368.

Sills G., Rogawski M., (2020) Mechanisms of action of currently used antiseizure drugs. *Neuropharmacology*, 168, 107966.

Silva A., González E., García M., Egea M., Fonseca J., Silva R., Santos D., Souto E., Ferreira D., (2011) Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): high pressure homogenization versus ultrasound. *Colloids Surfaces B*, 86, 158–165.

Smith M., Gumbleton M., (2006) Endocytosis at the blood-brain barrier: from basic understanding to drug delivery strategies. *Journal of Drug Targeting*, 14, 191-214.

Soni G., Kale K., Shetty S., Gupta M., Yadav K., (2020) Quality by design (QbD) approach in processing polymeric nanoparticles loading anticancer drugs by high pressure homogenizer. *Heliyon*, 6, (4), e03846.

Stamatovic S., Keep R., Andjelkovic A., (2008) Brain endothelial cell-cell junctions: how to “open” the blood-brain barrier. *Current Neuropharmacology*, 6 (3), 179-192.

Swissa E., Serlin Y., Vazana U., Prager O., Friedman A., (2019) Blood-brain barrier dysfunction in status epilepticus: Mechanisms and role in epileptogenesis. *Epilepsy & Behavior*, 101, 106285.

Toole C., Martinez I., Gaitanis J., Sunderam S., Ding L., DiCecco J., Besio W., (2019) Source localization of high-frequency activity in tripolar electroencephalography of patients with epilepsy. *Epilepsy & Behavior*, 101, 106519.

Tosi G., Musumeci T., Ruozi B., Carbone C., Belletti D., Pignatello R., Vandelli M., Puglisi G., (2016) The “fate” of polymeric and lipid nanoparticles for brain delivery and targeting: Strategies and mechanism of blood-brain barrier crossing and trafficking into the nervous central system. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 32, 66-76.



Treiman D., Woodbury D., (1995) Phenytoin: absorption, distribution and excretion. *Antiepileptic Drugs*, 4, 301-314.

Türk M., Hils P., Helfgen B., Schaber K., Martin H., Wahl M., (2002) Micronization of pharmaceutical substances by the Rapid Expansion of Supercritical Solutions (REES): a promising method to improve bioavailability of poorly soluble pharmaceutical agents. *Journal of Supercritical Fluids*, 22, 75-84.

Valdéz A., Negrete J., Magdaleno V., Martínez D., Fernández R., Almazán S., Torres M., Flores G., (2012) Electroencephalographic activity in neonatal ventral hippocampus lesion in adult rats. *Synapse*, 66, 738-746.

Valdéz R., González G., Castro E., (2019) Epidemiología del descontrol de la epilepsia en un servicio de urgencias neurológicas. *Revista de Neurología*, 68, 321-325.

Van der Staay F., Arndt S., Nordquist R., (2009) Evaluation of animal models of neurobehavioral disorders. *Behavioral and Brain Functions*, 23, 1-23.

Van Dycke A., Raedt R., Vonck K., Boon P., (2011) Local delivery strategies in epilepsy; a focus on adenosine. *Seizure*, 20, 376,382.

Villanueva M., (2011) Thomas Willis (1621-1675): Pionero de las neurociencias de vigencia universal. *Galenus*, 23, (4), 52-55.

Wang Y., Chen Z., (2019) An update for epilepsy research and antiepileptic drug development: toward precise circuit therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, 201, 77-93.

Weiergräber M., Henry M., Hescheler J., Smyth n., Schneider T., (2005) Electroencephalographic and deep intracerebral EEG recording in mice using a telemetry system. *Brain Research Protocols*, 14, 154-164.

Wilczewska A., Niemirowicz K., Markiewicz K., Car H., (2012) Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological Reports*, 64, 1020-1037.

Wolhfart S., Gelperina S., Kreuter J., (2012) Transport of drugs across the blood-brain barrier by nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 161, 264-273.

Xu L., Ding X., Wang T., Mou S., Sun H., Hou T., (2019) Voltage-gated sodium channels: structures, functions, and molecular modeling. *Drug Discovery Today*, 24, (7), 1389-1397.

Yang J., Ciftci O., (2016) Formation of hollow solid lipid micro and nanoparticles using supercritical carbon dioxide. *Food and Bioproducts Processing*, 98, 151-160.

Yoo S., Blackshaw S., (2018) Regulation and function of neurogenesis in the adult mammalian hypothalamus. *Progress in Neurobiology*, 170, 53-66.

Yoshikawa T., Pardridge W., (2001) Delivery of peptides and proteins through the blood-brain barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46, 247-279.

Yu Y., Kim E., Park D., Shim G., Lee S., Kim Y., Kim C., Oh Y., (2012) Cationic solid lipid nanoparticles for co-delivery of paclitaxel and siRNA. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 80, 268–273.

Yuen E., Trocóniz I., (2015) Can pentylenetetrazole and maximal electroshock rodent seizure models quantitatively predict antiepileptic efficacy in humans? *Seizure*, 24, 21-27.

Zavala C., López M., (2011) Modelos experimentales de epilepsia en ratas en desarrollo. *Revista eNeurobiología*, 2, (2), 1-16.

Zhao J., Ye Z., Yang J., Zhang Q., Shan W., Wang X., Wang Z., Ye S., Zhou X., Shao Z., Ren L., (2020) Nanocage encapsulation improves antiepileptic efficiency of phenytoin. *Biomaterials*, 240, 119849.

Zhou Y., Peng Z., Seven E., Leblanc R., (2018) Crossing the blood-brain barrier with nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 270, 290-303.

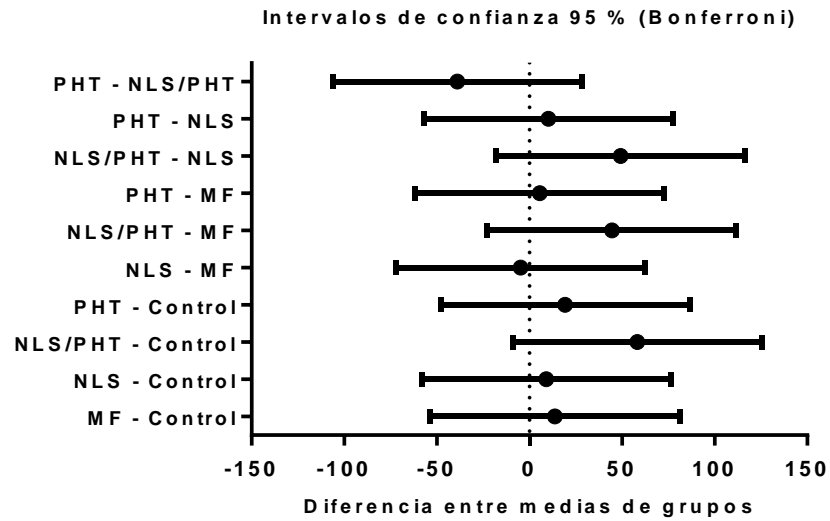
Zhu D., Zhang W., Nie X., Ding X., Zhang D., Yang L., (2020) Rational design of ultra-small photoluminescent copper nano-dots loaded PLGA micro-vessels for targeted co-delivery of natural piperine molecules for the treatment for epilepsy. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 205, 111805.

Zhu K., Aiani L., Pedersen N., (2020) Reconfigurable 3D-printed headplates for reproducible and rapid implantation of EEG, EMG and depth electrodes in mice. *Journal of Neuroscience Methods*, 333, 108566.

Zur Mühlen A., Schwarz C., Mehner W., (1998) Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery-drug release and release mechanism. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 45, 149-155.

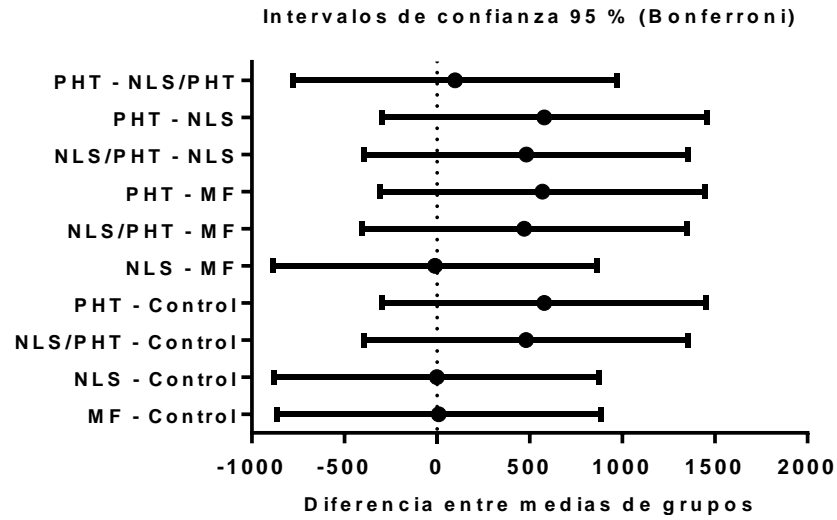
Zybina A., Anshakova A., Malinovskaya J., Melnikov P., Baklaushev V., Chekhonin V., Maksimenko O., Titov S., Balabanyan V., Kreuter J., Gelperina S., Abbasova K., (2018) Nanoparticle-based delivery of carbamazepine: A promising approach for the treatment of refractory epilepsy. *International Journal of Pharmaceutics*, 547, 10-23.

11. Anexos.



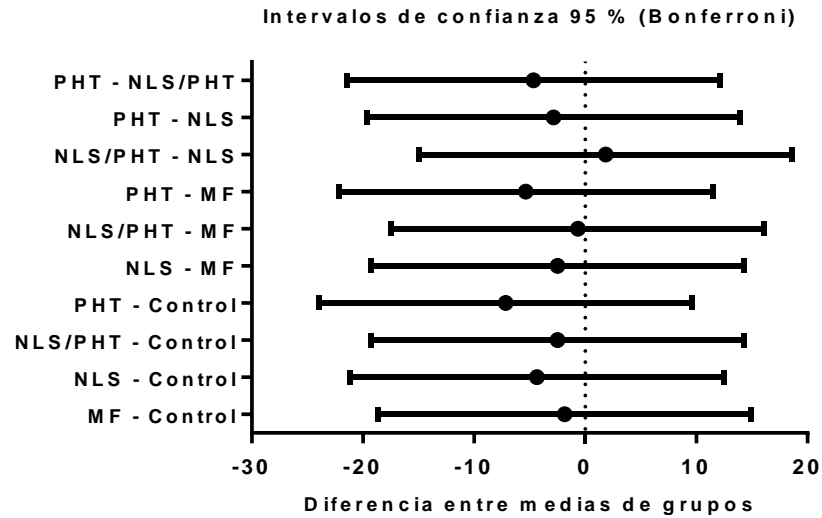
	Media	Límite Superior	Límite Inferior
MF - Control	13,83333	81,01529	-53,34862
NLS - Control	9,00000	76,18195	-58,18195
NLS/PHT - Control	58,33333	125,51530	-8,848621
PHT - Control	19,33333	86,51529	-47,84862
NLS - MF	-4,833333	62,34862	-72,01529
NLS/PHT - MF	44,50000	111,68200	-22,68195
PHT - MF	5,50000	72,68195	-61,68195
NLS/PHT - NLS	49,33333	116,51530	-17,84862
PHT - NLS	10,33333	77,51529	-56,84862
PHT - NLS/PHT	-39,00000	28,18195	-106,18200

Intervalos de confianza de las diferencias de medias grupales para latencia a Neck Jerks.



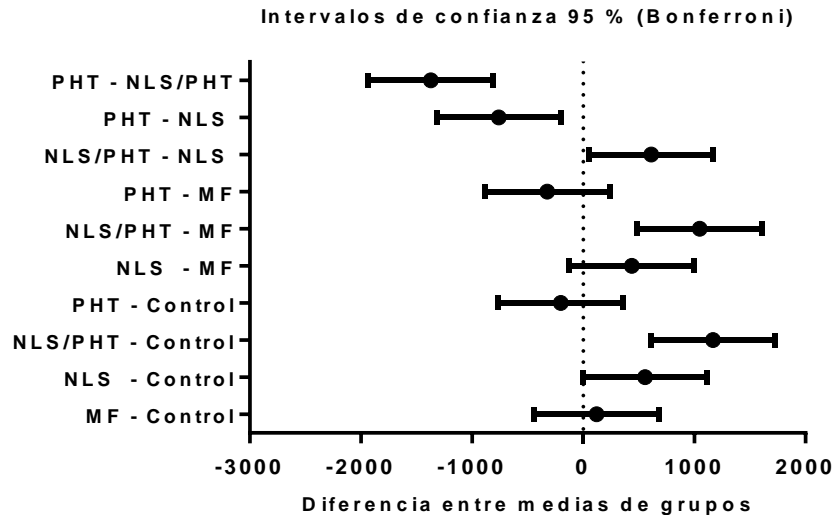
	Media	Límite superior	Límite inferior
<b>MF - Control</b>	9,833333	885,8231	-866,1564
<b>NLS - Control</b>	-0,8333333	875,1564	-876,8231
<b>NLS/PHT - Control</b>	481,500	1357,490	-394,4897
<b>PHT - Control</b>	579,000	1454,990	-296,9897
<b>NLS - MF</b>	-10,66667	865,3231	-886,6564
<b>NLS/PHT - MF</b>	471,6667	1347,656	-404,3231
<b>PHT - MF</b>	569,1667	1445,156	-306,8231
<b>NLS/PHT - NLS</b>	482,3333	1358,323	-393,6564
<b>PHT - NLS</b>	579,8333	1455,823	-296,1564
<b>PHT - NLS/PHT</b>	97,500	973,4897	-778,4897

Intervalos de confianza de las diferencias de medias grupales para latencia a crisis clónicas.



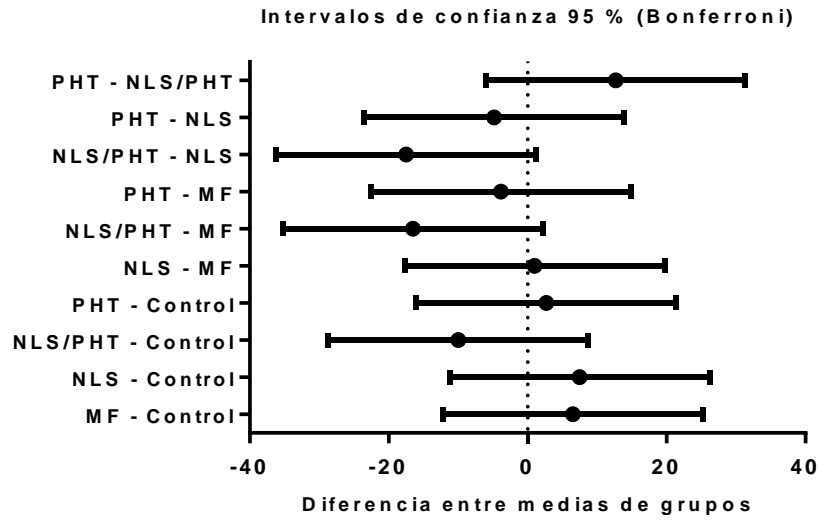
	Media	Límite Superior	Límite Inferior
<b>MF - Control</b>	-1,833333	14,94601	-18,61267
<b>NLS - Control</b>	-4,333333	12,446	-21,11267
<b>NLS/PHT - Control</b>	-2,500	14,27934	-19,27934
<b>PHT - Control</b>	-7,166667	9,612673	-23,946
<b>NLS - MF</b>	-2,500	14,27934	-19,27934
<b>NLS/PHT - MF</b>	-0,6666667	16,11267	-17,446
<b>PHT - MF</b>	-5,333333	11,446	-22,11267
<b>NLS/PHT - NLS</b>	1,833333	18,61267	-14,94601
<b>PHT - NLS</b>	-2,833333	13,94601	-19,61267
<b>PHT - NLS/PHT</b>	-4,666667	12,11267	-21,446

Intervalos de confianza de las diferencias de medias grupales para duración de crisis clónicas.



	Media	Límite superior	Límite inferior
MF - Control	120,3333	680,9142	-440,2475
NLS - Control	556,500	1117,081	-4,080872
NLS/PHT - Control	1168,000	1728,581	607,4191
PHT - Control	-202,3333	358,2476	-762,9142
NLS - MF	436,1667	996,7476	-124,4142
NLS/PHT - MF	1047,667	1608,248	487,0858
PHT - MF	-322,6667	237,9142	-883,2476
NLS/PHT - NLS	611,500	1172,081	50,91913
PHT - NLS	-758,8333	-198,2524	-1319,414
PHT - NLS/PHT	-1370,333	-809,7525	-1930,914

Intervalos de confianza de las diferencias de medias grupales para latencia a crisis tónico-clónicas.



	Media	Límite Superior	Límite Inferior
MF - Control	6,500	25,19987	-12,19987
NLS - Control	7,500	26,19987	-11,19987
NLS/PHT - Control	-10,000	8,699867	-28,69987
PHT - Control	2,666667	21,36653	-16,0332
NLS - MF	1,000	19,69987	-17,69987
NLS/PHT - MF	-16,500	2,199867	-35,19987
PHT - MF	-3,833333	14,86653	-22,5332
NLS/PHT - NLS	-17,500	1,199867	-36,19987
PHT - NLS	-4,833333	13,86653	-23,5332
PHT - NLS/PHT	12,66667	31,36654	-6,0332

Intervalos de confianza de las diferencias de medias grupales para duración de crisis tónico-clónicas.