



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DESARROLLO DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE
EPILEPSIA EN RATONES PARA EL ESTUDIO DE LA
ACTIVIDAD ANTICONVULSIVANTE DE LOS
EXTRACTORES DE LA RAIZ IPOMOEA STANS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

MARIO ALEJANDRO REYES LEZAMA



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

1. INTRODUCCION	1
1.1 Generalidades del sistema nervioso central	1
1.1.1 Sinapsis eléctrica	4
1.1.2 Sinapsis química	5
1.1.2.1 Neurotransmisores	8
1.2 Convulsiones y sistema nervioso	9
1.2.1 Modelo para el estudio de crisis convulsivas	16
1.3 Kindling	17
1.3.1 Kindling eléctrico	17
1.3.2 Kindling químico	19
1.4 Anticonvulsivantes	21
1.4.1 Plantas con propiedades anticonvulsivas	22
1.5 <i>Ipomoea stans</i>	23
2. OBJETIVOS	27
3. MATERIAL Y METODOS	28
3.1 Extractos obtenidos de la raíz de <i>Ipomoea stans</i>	28
3.2 Desarrollo del Kindling químico en ratones	30
4. RESULTADOS	39
4.1 Extractos obtenidos de la raíz de <i>Ipomoea stans</i>	39
4.2 Desarrollo del Kindling químico en ratones	40
4.3 Efecto de la administración de los diferentes extractos de la raíz de <i>Ipomoea Stans</i> sobre las convulsiones presentadas en el modelo convulsivo....	45
5. DISCUSION	51
6. BIBLIOGRAFIA	58

ABREVIATURAS

SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
Å	Amstrong
Na ⁺	Sodio
K ⁺	Potásio
Cl ⁻	Cloro
Ca ⁺⁺	Calcio
mEq	Miliequivalente
l	Litro
ATPasa Na-K	Bomba Na-K
ATP	Adenosin trifosfato
GABA	Acido Gama Amino Butírico
mg	Miligramo
Kg	Kilogramo
ms	Milisegundo
cm	Centímetro
°C	Grado centígrado
gr	Gramo
i.p.	Intraperitoneal
PTZ	Pentilentetrazol
D	Daltones
µm	Micrómetro

1. INTRODUCCION

1.1 Generalidades del Sistema Nervioso Central

Los seres vivos presentan la característica de responder ante los estímulos del medio ambiente.

Para poder responder correctamente ante estos estímulos, los organismos han de desarrollar un sistema que puede captar la información del medio externo, procesarla, almacenarla y responder ante un estímulo determinado. En el reino animal este mecanismo en su conjunto recibe el nombre de Sistema Nervioso.

En los vertebrados el Sistema Nervioso ha sido dividido en Sistema Nervioso Central, que está formado por el cerebro y la médula espinal, y Sistema Nervioso Periférico, que a la vez se divide en sistema simpático y parasimpático, así como órganos sensoriales. El cerebro se relaciona directamente con el análisis y la integración de la información del medio ambiente para la producción de respuestas ante los estímulos recibidos a través de los órganos sensoriales. La médula espinal es un centro de importancia para las respuestas reflejas y constituye la vía principal de la conducción de los impulsos de los nervios periféricos hacia los centros nerviosos

superiores. El sistema simpático y parasimpático, juntos mantienen la homeostasis en el organismo. El sistema simpático surge de los segmentos torácico y lumbar de la médula espinal, el parasimpático de los nervios craneales y de la médula espinal sacra. En su conjunto inervan casi todos los órganos y músculos del cuerpo. Presentan acciones antagónicas sobre las zonas que inervan, predominando la acción de uno de los dos sistemas (1).

En el cerebro, las unidades fundamentales capaces de recibir información, almacenarla y/o analizarla, así como dar la respuesta a corto o largo plazo, son las neuronas.

Una neurona es una célula nerviosa especializada en analizar y conducir información, está constituida por un soma que presenta un aparato bioquímico similar a cualquier otra célula; también presenta una serie de prolongaciones con funciones específicas para la recepción y emisión de información, que se ramifican y establecen contacto con otras células. Estas prolongaciones celulares pueden distinguirse en axones y dendritas, dependiendo de la dirección en la que se transmita la información. Las dendritas son especializaciones receptoras de la neurona, por lo general son cortas, gruesas y muy ramificadas. Mientras que los axones forman la vía de salida de la información de

estas células, se caracterizan por ser largos, delgados, con muy pocas o ninguna ramificación (2).

El tipo de información que manejan estas células es a través de señales eléctricas. Mediante el cambio en la permeabilidad de la membrana neuronal, principalmente a los iones Na^+ y K^+ , es como se produce esta señal eléctrica, llamada potencial de acción.

La base fundamental del funcionamiento del Sistema Nervioso la constituye la comunicación que se establece entre las diferentes células que lo forman. El axón de una neurona puede hacer contacto con el soma de otra neurona, con dendritas o con otros axones. Este contacto se lleva a cabo a través de estructuras especializadas en la terminal axónica y en la membrana de la célula con la que se hace el contacto, llamadas sinapsis.

En los sitios de contacto sináptico la parte correspondiente al axón se considera como presinapsis, se le denomina botón sináptico y es la emisora de información, mientras que la parte receptora de información es a la que se denomina membrana postsináptica.

En la región presináptica se encuentran todos los mecanismos de transferencia de señales. Contiene mitocondrias, vesículas sinápticas y un engrosamiento de la membrana celular

que se restringe a la zona de contacto con la membrana postsináptica, esta parte de la membrana se especializa en el manejo de información (3).

La sinapsis, según el tipo de mecanismo que utilice para la transferencia de señales de la presinapsis a la postsinapsis puede ser eléctrica o química (4, 5).

1.1.1 Sinapsis Eléctricas.

Estructuralmente, las sinapsis eléctricas se caracterizan por una zona de acercamiento de las membranas plasmáticas de las neuronas entre las que se establece el contacto, con una mínima especialización estructural de los elementos submembranales de ambos lados. La distancia que separa la presinapsis de la membrana postsináptica es de aproximadamente 20-50 Å. En cortes paralelos al plano horizontal de la membrana plasmática y mediante el empleo de trazadores de espacio intercelular se observa en la superficie de la célula un patrón hexagonal formado por proteínas, cuya porción central esta constituida por un arreglo de 6 monómeros protéicos de 26 000 D de peso molecular (conexinas), el hexámero recibe el nombre de conexón. Los conexones forman poros que comuni-

can el citoplasma de las células en contacto, permitiendo el paso de señales eléctricas y metabolitos que viajan a través de la membrana debido a la baja resistencia que le confieren los poros de la membrana al sitio de la sinapsis (3, 6). La apertura de estos poros está regulada por la concentración intracelular de Ca^{++} ; cuando el Ca^{++} intracelular aumenta, los poros se cierran. El paso de señales es bidireccional, esto es, los poros no imponen restricciones al paso de señales más que de tamaño.

1.1.2 Sinapsis Químicas.

En el caso de las sinapsis químicas se requiere una serie de traducciones de la información: una señal eléctrica en la membrana presináptica es traducida a una señal química que consiste en un neurotransmisor, que una vez liberado al espacio sináptico, interacciona con receptores específicos presentes en la membrana postsináptica generándose una señal eléctrica y/o metabólica en la célula postsináptica (2).

En este tipo de sinapsis la distancia entre la membrana presináptica y la membrana postsináptica es de aproximadamente 200 Å en la mayoría de los casos.

En el Sistema Nervioso Central (SNC) de vertebrados las sinapsis químicas son mucho más abundantes que las sinapsis eléctricas (6).

En estado de reposo, la membrana plasmática de la neurona mantiene distintas concentraciones de los iones Na^+ , K^+ , Cl^- entre el medio interior y el exterior, dando origen a un gradiente de concentraciones, el cual se debe a la permeabilidad selectiva de la membrana al potasio; las concentraciones de estos iones en el interior son 140 mEq/l de K^+ , 10 mEq/l de Na^+ , 4 mEq/l de Cl^- , y en el exterior son de 5 mEq/l de K^+ , 142 mEq/l de Na^+ , 103 mEq/l de Cl^- (5). Este gradiente se mantiene por la permeabilidad selectiva de la membrana al potasio, y a la acción del intercambiador (ATPasa) Na^+-K^+ , el cual intercambia 3 iones Na^+ del interior por 2 iones K^+ del exterior celular, mediante el consumo de Adenosin trifosfato (ATP). El gradiente electroquímico del K^+ genera el potencial de reposo de la membrana, el cual se encuentra entre -75 y -90 mv dependiendo de la célula (3).

Al llegar un estímulo a la terminal sináptica, ocurre un cambio en la polaridad de la membrana, debido a una modificación de la permeabilidad de la membrana a los iones Na^+ . Lo que permite la entrada masiva de este ion al interior de la terminal sináptica, produciendo una despolarización de la

membrana. Este cambio de potencial transitorio activa canales de Ca^{++} sensibles a voltaje, aumentando así, la permeabilidad de la membrana a este ion. Dentro del botón sináptico, los iones Ca^{++} disparan a través de un mecanismo aún desconocido, la maquinaria responsable de la liberación del neurotransmisor (8).

Una vez liberado el neurotransmisor, atraviesa el espacio sináptico e interacciona con una molécula específica de naturaleza proteica llamada receptor localizada en la membrana postsináptica. La formación del complejo Neurotransmisor-receptor, origina una serie de cambios en la membrana postsináptica que depende del tipo de efecto inducido por el neurotransmisor sobre el receptor. Es excitador si su interacción con el receptor postsináptico induce la entrada de iones Na^+ en la postsinápsis produciendo una despolarización; mientras que si el neurotransmisor liberado es inhibidor propicia la entrada de iones K^+ o Cl^- , ocasionando una hiperpolarización con lo cual disminuye la probabilidad de disparo de potenciales de acción.

Existen dos mecanismos diferentes responsables de la remoción del neurotransmisor del espacio sináptico. Una vez que ha efectuado su acción, el neurotransmisor puede ser retomado por la terminal presináptica o por las células gliales.

Otro mecanismo consiste en la degradación enzimática del neurotransmisor "in situ", convirtiéndolo en metabolitos que no presentan acción fisiológica (1).

Algunos de los neurotransmisores identificados en el Sistema Nervioso de mamíferos se enlistan a continuación:

1.1.2.1 Neurotransmisores.

- a) Acido Aspártico, excitador del Sistema Nervioso Central.
- b) Acido Glutámico, excitador del Sistema Nervioso Central.
- c) Glicina, inhibidor en médula espinal.
- d) Acido Gama Amino Butírico (GABA), inhibidor del sistema nervioso central.

Aminas Biogénicas.

- a) Noradrenalina, inhibidor en el Sistema Nervioso Central.
- b) Adrenalina, inhibidor en el Sistema Nervioso Central.
- c) Dopamina, inhibidor en el Sistema Nervioso Central.
- d) Serotonina, inhibidor en el Sistema Nervioso Central.

Poliaminas.

- a) Acetilcolina, su efecto es mixto y depende del tipo de acción sobre el receptor, excitador en los receptores nicotínicos y excitador e inhibidor en los receptores muscarínicos (4).

1.2. Convulsiones y Sistema Nervioso Central.

El Desarrollo de todos los procesos cerebrales requieren de una correcta comunicación neuronal. Esta comunicación se ve frecuentemente modificada en las enfermedades cerebrales. Tal es el caso de la enfermedad de Parkinson, en la cual, una disminución de los niveles de dopamina en el núcleo estriado produce movimientos clónicos de los miembros anteriores. La *miastenia gravis*, enfermedad en la cual el mismo organismo produce anticuerpos que atacan a los receptores colinérgicos, en la placa neuromuscular.

En el caso de la epilepsia, descargas simultáneas y rítmicas de un gran número de neuronas, provoca pérdida de conciencia, generalmente con movimientos corporales característicos o convulsiones.

En 1973 la Liga Internacional contra la Epilepsia y la

Organización Mundial de la Salud definieron el término Epilepsia como: Afección crónica de etiología diversa, caracterizada por crisis recurrentes, debidas a una descarga excesiva de neuronas cerebrales (crisis epiléptica) asociadas eventualmente con diversas manifestaciones clínicas y paraclínicas.

La crisis epiléptica se clasifica de acuerdo al cuadro clínico y al registro encefalográfico que presente el paciente (10, 23, 26), así tenemos:

Crisis de ausencia: Se caracteriza por inconsciencia breve y repetida, con actividad clónica simétrica que varía desde parpadeo hasta sacudidas en todo el cuerpo y en ocasiones sin actividad motora.

Crisis convulsivas o no convulsivas, en las que las primeras manifestaciones se generan en ambos hemisferios cerebrales. La pérdida de la consciencia puede ser una manifestación única o el inicio de la crisis convulsiva inicial.

Crisis epilépticas no clasificadas, incluye crisis neonatales, por ejemplo, movimientos oculares rítmicos y movimientos de natación, masticación y mioclonos.

Adendum, abarca crisis convulsivas cíclicas relacionadas, por ejemplo: con ciclos menstruales, ataques provocados por fátiga, alcoholismo, emociones o tensión nerviosa (10, 23, 24, 25, 26).

Un agente químico puede inducir la aparición de crisis convulsivas interfiriendo a diferentes niveles los mecanismos de acción de la transmisión sináptica. Esto puede ocurrir bajo las siguientes condiciones:

1. Falta o reducción de los niveles de neurotransmisores en las terminales sinápticas. Esto se puede deber a la disminución de la síntesis del neurotransmisor, inhibición en el almacenamiento y/o degeneración de la terminal sináptica.
2. Alteración de los mecanismos de acción de los neurotransmisores en el espacio intersináptico. Así el neurotransmisor no llega a la postsinápsis, ya sea por un incremento en las enzimas encargadas de la remoción del transmisor, por aumento en el sistema de captura de alta afinidad presente en la presinápsis y/o por las células gliales.
3. Alteración en los receptores postsinápticos. Este fenómeno ocurre por la presencia de antagonistas del neurotransmisor, por modificaciones en la estructura química o número de receptores existentes en la postsinapsis, interferencia en la actividad de los canales iónicos o por modificaciones en los sistemas enzimáticos asociados con el receptor (11).

Los agentes convulsivantes más empleados en este tipo de estudios son:

L-GLUTAMATO MONOSODICO.

Respecto al mecanismo de la producción de las crisis convulsivas, las evidencias parecen indicar un probable desequilibrio entre los sistemas de excitación e inhibición. El L-GLUTAMATO es un neurotransmisor excitador central y el sustrato para la síntesis del ACIDO GAMA AMINO BUTIRICO (GABA), neurotransmisor inhibitor. Se ha observado que el L-GLUTAMATO produce disminución en los niveles de Norepinefrina y Dopamina (12, 13).

BICUCULINA

El mecanismo de acción de la BICUCULINA es por medio de la inhibición de la acción del GABA. Compite con el GABA para ocupar el sitio de unión de los receptores postsinápticos. La dosis convulsiva para el mono es de 0.1 a 0.4 mg/Kg por vía subcutánea (12, 15).

ESTRICNINA

Se considera a la ESTRICNINA como antagonista del receptor al neurotransmisor GLICINA, neurotransmisor inhibitor del sistema nervioso. La dosis de 2 mg/Kg administrada por vía intraperitoneal a ratones produce crisis convulsivas generalizadas en el 58% de los animales, de los cuales el 58%

mueren debido a la convulsión (12, 13)

4-AMINOPIRIDINA

Incrementa la liberación de neurotransmisor como el GABA tanto "*in vivo*" como "*in vitro*". Su acción puede deberse al bloqueo de los canales de potasio o a un efecto directo sobre la cinética de los canales de calcio sensibles a voltaje. La inyección intraperitoneal de 5 mg/Kg en ratones de 15 días de edad, produce convulsiones en más del 90% de los animales. Generalmente el 80% de los animales tratados de esta manera mueren durante la crisis convulsiva (12, 14).

PENICILINA

Se ha postulado que antagoniza la acción inhibidora del GABA; Sin embargo no son bien conocidos los mecanismos celulares del efecto patógeno de la PINICILINA (12).

ALUMINA

Después de la aplicación tópica de la crema de ALUMINA en la corteza cerebral de gatos adultos se aprecia una disminución del número de neuronas inhibitoras y una pérdida de terminales sinápticas que contienen GABA. Aparentemente los animales más susceptibles a desarrollar el fenómeno epiléptico en este tipo de modelo son los primates (12).

COBALTO

El COBALTO produce severas alteraciones morfológicas en el tejido nervioso, después de su aplicación se observa una acentuada destrucción celular. La aplicación de 30 mg de polvo de COBALTO en la corteza motora de la rata, produce movimientos clónicos contralaterales a la región de aplicación. Estos movimientos duran de 2 a 3 días, después de los cuales aparecen las crisis generalizadas (12).

ELECTROCHOQUES

El procedimiento consiste en aplicar a la corteza cerebral estímulos eléctricos para desencadenar una crisis convulsiva generalizada. El estímulo consiste en un tren de pulsos rectangulares de 0.2 mseg de duración y una frecuencia de 60 a 100 pulsos por segundo (12).

PICROTOXINA

La PICROTOXINA actúa como bloqueador de la acción del GABA, específicamente, compite por el receptor postsináptico. En el ratón, la administración de 5.9 mg/Kg por vía subcutánea produce en el 50% de los animales crisis convulsivas generalizadas (12, 16).

TIOSEMICARBOZIDA

Compuesto químico que inhibe el funcionamiento de la enzima glutamato descarboxilasa, enzima encargada de la síntesis del GABA (16).

PENTILENTETRAZOL

A nivel neuronal, el PTZ aumenta la excitabilidad del SNC en general, al reducir la inhibición. Su efecto es sobre la membrana neuronal, reduciendo selectivamente la conductancia al Cl^- , anión utilizado en la comunicación celular por neurotransmisores de tipo inhibitorio, como el GABA (40). Aumenta la concentración extracelular de K^+ en la corteza cerebral a través de cambios en la conductancia a este ión, tanto en la membrana neuronal como glial (47). Esta acción, probablemente se encuentra relacionada con el efecto reportado por Mc Canless y Dworsky, en el que miden la disminución en la concentración cerebral de metabolitos de alta energía, como el ATP, por la administración de dosis convulsiva de PTZ en monos (46). Por otro lado, se ha reportado la disminución en la liberación de GABA en rebanadas de corteza cerebral de rata (15). El tipo de convulsiones que se presentan por la administración de PENTILENTETRAZOL, se caracteriza por movimientos clónicos

asincrónicos generalizados, seguidos de convulsiones tónicas que presentan movimientos de los miembros consistentes en flexiones seguidas de extensiones (12, 16).

1.2.1. Modelos para el estudio de crisis convulsivas.

Experimentalmente pueden inducirse crisis convulsivas en animales de laboratorio a través de diferentes tratamientos. Entre ellos se encuentra el choque eléctrico y la administración de agentes químicos. La PICROTOXINA, el PENTILENTETRAZOL, la BICUCULINA y la ESTRICNINA están entre los agentes convulsivantes más empleados en investigación (2, 12, 13, 18).

Existen dos formas de inducir crisis convulsivas, dependiendo de la dosis del tratamiento. En forma aguda con dosis elevadas y en forma crónica mediante dosis menores. Se pueden administrar dosis elevadas de agentes inductores de convulsiones (dosis letales), en este caso la convulsión se presenta inmediatamente después de la administración. El otro tratamiento consiste en administrar dosis más bajas (sub convulsivas) durante un período más prolongado de tiempo, hasta que el animal presenta crisis convulsivas con una dosis que originalmente no la producía.

1.3. Kindling.

1.3.1. Kindling Eléctrico.

Goddard en 1966 describe la aparición de un cuadro convulsivo producido mediante la estimulación eléctrica subumbral de forma crónica de ciertas regiones cerebrales (regiones amigdaloides e hipocampales). A este fenómeno Goddard dio el nombre de "Kindling".

El cambio de excitabilidad observado por Goddard consiste en el aumento progresivo en las respuestas neuronales y cambios conductuales que culminan con la aparición de la crisis convulsiva. Lo que Goddard buscó al inducir crisis convulsivas mediante esta técnica fue disminuir la latencia entre el momento de la estimulación y la aparición de la convulsión conforme transcurría el tratamiento (umbral de convulsión) (17). La característica fundamental de este fenómeno es su aparición gradual y su cronicidad una vez establecido.

Las características del tratamiento realizado por Goddard fueron las siguientes: la estimulación eléctrica era de baja intensidad $6 \mu\text{A}$ y 0.2 mseg de duración, una estimulación por día durante un período variable (4 semanas-

136 días). Este tipo de estimulación produjo una convulsión tónico-clónica, generando cambios neuronales permanentes en el animal estimulado, aún suspendiendo su tratamiento durante varias semanas después de generalizadas las convulsiones. El Kindling se puede inducir en todos los mamíferos y en algunos anfibios como la rana (20). Es condición necesaria que el animal de experimentación para el desarrollo del Kindling sea adulto. A nivel neuronal, se han observado cambios en la concentración de neurotransmisores y neuromoduladores, así como modificaciones en la cinética de unión de éstos con su receptor, en animales que desarrollan Kindling eléctrico amigdalino. Por ejemplo, se ha reportado una disminución en la liberación de Dopamina y Noradrenalina (42), cambios en la cinética de unión y el número de receptores muscarínicos (43) y Beta-adrenérgicos (44), así como cambios en la liberación de encefalinas en animales que desarrollan Kindling (41).

En 1972, Racine propone una clasificación de los estadios conductuales para la rata sometida a Kindling (19, 20).

ESTADIO I	Movimientos del hocico y la cara.
ESTADIO II	Movimientos oscilatorios de la cabeza.

ESTADIO III	Sacudida clónica de las patas anteriores.
ESTADIO IV	Erección. El animal se yergue y se sostiene en sus patas posteriores.
ESTADIO V	Erección y caída al suelo, crisis generalizada.

Este modelo convulsivo se conoce con el nombre de "Kindling eléctrico".

1.3.2. Kindling Químico.

Basándose en los descubrimientos de Goddard, en los que la estimulación crónica en dosis sub-convulsivas, produce a largo plazo cambios neuronales permanentes que permiten la aparición de un cuadro convulsivo a través de un estímulo sub-convulsivo, Ito (1977) trata de reproducir el fenómeno anteriormente descrito por Goddard, comparando sus resultados con los de Goddard a través de el registro encefalográfico tanto de los animales sometidos a estímulos eléctricos como los sometidos a estímulos químicos como es el PTZ (18).

Los aportes del trabajo de Ito con respecto a los de Goddard fueron:

El cambio de estímulo, de un estímulo eléctrico a un estímulo químico como es la aplicación del pentilentetrazol. Posteriormente se emplearon todos los convulsivantes conocidos.

La modificación en la administración del estímulo. De la implantación de electrodos en ciertas regiones cerebrales a la administración del estímulo a través de inyección por vía intraperitoneal. Ito administró crónicamente pentilentetrazol a ratas en dosis sub-convulsivas por vía intraperitoneal durante ocho días, observando el mismo cuadro convulsivo que obtuviera Goddard.

En la actualidad la técnica descrita por Goddard se conoce con el nombre de "Kildling eléctrico", mientras que el trabajo de Ito recibe el nombre de "Kindling químico" (18).

El "Kindling" ahora es generalmente aceptado como un modelo de epilepsia y epileptogénesis. Dentro del "Kindling químico" el pentilentetrazol es reconocido como un modelo farmacológico que produce un trazo encefalográfico semejante al presentado en las crisis epilépticas de pequeño mal (35) y gran mal (45).

1.4 Anticonvulsivantes.

Se denomina droga anticonvulsiva al fármaco que aumenta la latencia o previene la aparición de un ataque epiléptico sin producir depresión del sistema nervioso. Por ejemplo: el fentobarbital sódico y el pentobarbital sódico son utilizados a nivel clínico como anticonvulsivantes, sedantes y anestésicos. El pentobarbital, es un efectivo anticonvulsivante poco empleado a nivel clínico debido a su indeseable actividad sedante. Por el contrario, el fentobarbital presenta efecto anticonvulsivo sin producir acción sedante (45).

Los anticonvulsivantes actúan de acuerdo a su estructura, impidiendo la aparición de las crisis convulsivas. Esto puede llevarse a cabo a través de dos mecanismos:

1. Mediante un proceso antagónico de la acción del convulsivante, produciendo la reversión del efecto del convulsivante una vez establecida su acción.
2. Disminuyendo el umbral de excitabilidad de las neuronas responsables del proceso convulsivo (38, 39).

Se han realizado innumerables investigaciones con el fin de encontrar medicamentos que prevengan, controlen o

eliminen las diferentes fuentes generadoras de convulsiones que se presentan en el hombre. A pesar que en la clínica se utilizan varios compuestos con propiedades antiepilépticas, solo se conoce el mecanismo de acción de un número muy reducido de éstos, puesto que para entender como actúan estas substancia se requiere conocer:

1. Como llegan estos fármacos al sistema nervioso y como se distribuyen en él.
2. Los cambios bioquímicos que tales compuestos producen en el sistema nervioso, sobre todo en relación con los neurotransmisores.
3. En que regiones del sistema nervioso actúan dichos compuestos.
4. Como modifican la actividad epiléptica del sistema nervioso los cambios bioquímicos producidos (58).

1.4.1 Plantas con propiedades anticonvulsivas.

La flora mexicana, una de las más ricas en el mundo por su variedad, ha sido utilizada por el hombre como fuente de recursos para aliviar sus enfermedades y para otros usos.

Entre los valores terapéuticos de las plantas conocidas

se encuentran propiedades anticonvulsivantes. Sin embargo, existen pocos ejemplos del estudio formal de estas propiedades, por ejemplo: De las raíces de *Heracleum sibiricum* y *H verticillatum* (Fam. Umbelliferae), se extrajeron furocumarinas, denominadas esponodina, pimpinellina, isopimpinellina, bergapteno, isobergapteno y angicina, las cuales se probaron en estados convulsivos inducidos por: electrochoques, pentilentetrazol y estriquina. Los resultados obtenidos en este trabajo fueron: disminución de la intensidad de las convulsiones inducidas por electrochoques y pentilentetrazol de un 35% a 60% (22).

1.5 *Ipomoea stans*.

La raíz de *Ipomoea stans* en 1932 aparece reportada como anticonvulsivante por Solis R. (28), también se ha utilizado como purgante y sudorífico (27).

Clasificación

Reino	Vegetal
División	Embryophyta Siphonogamia
Subdivisión	Angiospermas
Clase	Dicotyledoneas

Subclase	Metachalamideae
Orden	Tubiflorae
Familia	Convulvulaceae
Genero	<i>Ipomoea</i>
Especie	<i>I. stans</i>

Descripción: *Ipomoea stans*, comunmente conocida como tumbavaqueros, Tlaxcapan, pegajosa, canibata, toloompatl, velichpacli, raíz de Jalpa. Es una hierba ascendente, ramosa mide entre 40 y 80 cm de altura, presenta un rizoma voluminoso, sus hojas son alternadas cortamente pecioladas de forma ovalo-lanceolada, con el borde ligeramente aserrado, su ápice es truncado y su base subcordada, mide de 3 a 5 cm de largo, presenta dos bráctias, papiraceas apicales. Su corola es infundibuliforme de 5 a 6 cm de largo, color púrpura. Epoca de floración de julio a septiembre. Se encuentra en toda la Mesa Central, en especial en el estado de Hidalgo (29, 30). Presenta una distribución geográfica amplia, sin embargo, las concentraciones de los diferentes compuestos presentes en esta planta varían de acuerdo a los diferentes habitats.

En 1930, se probó en pacientes de los hospitales de la Castañeda y San Hipólito, en México, D. F.

En el laboratorio Químico Central, el doctor Secundino Sosa obtuvo un extracto de la raíz de *I. stans* y la administró en diferentes concentraciones y por diferentes vías en pacientes que presentaban convulsiones tónico-clónicas. Se observaron efectos secundarios colaterales inmediatamente después de la inyección, como la elevación de la temperatura a 40°, pérdida de apetito y náuseas. Cuando la aplicación era intraperitoneal o endovenosa y en el caso de la aplicación intramuscular, producía hematomas dolorosos que desaparecían al tercer día de tratamiento. Los resultados reportados fueron: en el caso de administración oral, una disminución en la frecuencia de las convulsiones; cuando la aplicación era intravenosa se reducía en un 90% el número de convulsiones (21, 22). Aunque en estos reportes no se indican que tipo de extracciones fueron aplicadas, qué tipo de compuestos se obtuvieron y en qué dosis se administraron.

En 1982, López Laiseca obtuvo dos diferentes extractos (liofilizado total y extracto butanólico) de la raíz de *I. stans*, los cuales fueron probados en un modelo convulsivo de dosis letal contra diferentes fármacos (PICROTOXINA, TIOSEMICARBAZIDA Y PENTILENTETRAZOL), no encontrando efecto protector contra las convulsiones producidas por PICROTOXINA Y TIOSEMICARBAZIDA. Sin embargo, para el caso de PENTILEN-

TETRAZOL el liofilizado total produjo un pequeño aumento en la latencia de la aparición de la primera convulsión. A pesar de esto el efecto no fue muy claro. Concluye su trabajo diciendo "Es necesario para probar los diferentes compuestos de la raíz de *Ipomoea stans*, un modelo convulsivo en el cual el parámetro de número de convulsiones y período de latencia de la convulsión puedan ser conocidos" (31).

Los estudios sobre la actividad anticonvulsiva de los extractos de la raíz de *I. stans* realizados con un modelo agudo de convulsiones (31) no permitieron evaluar el posible efecto anticonvulsivo adecuadamente, por lo que decidimos implementar el modelo crónico de convulsiones en ratones, conocido como "Kindling químico", esto nos permitió estudiar más a fondo la actividad anticonvulsivante de los extractos de la raíz de *I. stans* y evaluar su efecto anticonvulsivo en los diferentes estadios del "Kindling".

2. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es el de determinar el posible efecto anticonvulsivante de los extractos obtenidos a partir de la raíz de *Ipomoea stans*. Para esto, desarrollamos un modelo experimental de epilepsia en el cual el parámetro de número de convulsiones y período de latencia de la convulsión pueden ser conocidos ("Kindling Químico").

3. MATERIAL Y METODOS

3.1 Extractos obtenidos de la raíz de *Ipomoea stans*.

Para la obtención de los diferentes extractos se emplearon raíces de *I. stans* colectadas en el kilómetro 100 de la carretera Pachuca-Hidalgo.

Las extracciones fueron realizadas en el laboratorio del Dr. Federico García del Instituto de Química de la U.N.A.M. El sistema de extracción de los diferentes compuestos a grandes rasgos es el siguiente:

La raíz de la planta de *I. stans* fue secada y molida obteniéndose un kilogramo de polvo, el polvo obtenido de este tratamiento se sometió a ebullición en agua durante 3 horas; la infusión obtenida en un volumen de 15 l. se liofilizó, obteniéndose un residuo de 150 gr. el cual fue sometido a una extracción con hexano, dando como resultado 2.8 gr. de un aceite, en el cual mediante cromatografía de capa fina (hexano-acetato de etilo 2:1, v/v) se identificó sitosterol (7 mg) además de aceites.

El polvo remanente después del tratamiento con hexano se extrajo con cloroformo y al evaporar el disolvente, se obtu-

vieron 117 mg de ácido 3-hidroxi, 4-metoxi cinámico.

El residuo remanente después de la extracción con cloroformo se trató con acetato de etilo y al evaporar el disolvente se obtuvieron 199 mg de un compuesto identificado como hidroxi, 6-metoxi cumarina. Posteriormente se realizó una extracción continua con acetona, del residuo tratado con acetato de etilo, obteniéndose 2.5 gr de un compuesto que al separarse por cromatografía en placa fina (cloroformo-metanol-hidróxido de amonio 4:4:1, v/v) se identificó la presencia de arabinosa y manosa, así como escopoletina.

El producto de la extracción con acetona se sometió a extracción continuamente con metanol, obteniéndose 5.2 gr de un compuesto con aspecto de jarabe, el cual presentó 5 manchas en cromatografía en capa fina, eluyendo con butanol-acético-agua 5:1:4 v/v. La franja correspondiente al Rf 0.15 dio prueba positiva para alcaloides (reactivo de Dragendorff). Del producto anteriormente obtenido se hidrolizaron 2 gr con HCL 3 N en frío y se sometió a reflujo durante 24 horas, se extrajo con cloroformo, obteniéndose 2 mg de 7-hidroxi, 6-metoxi cumarina. La fase acuosa se neutralizó con NaHCO₃ y se extrajo con acetato de etilo; al evaporar se obtuvieron 1.2 gr de ácido 3-hidroxi, 4-metoxi sinámico.

Finalmente, el residuo remanente después de la extracción con los diferentes solventes, se extrajo con butanol, obteniéndose 430 mg de un compuesto identificado como acetamida (ver resumen en la tabla I).

Los compuestos probados fueron:

Liofilizado total	200 mg/Kg peso
7-hidroxi 6-metoxi cumarina	200 mg/Kg peso
Escopoletina	200 mg/Kg peso
Extracto metanólico	200 mg/Kg peso
Acetamida	200 mg/Kg peso

Las concentraciones fueron tomadas del trabajo de López L. (31), en base a una curva de concentración vs respuesta.

3.2 Desarrollo del Kindling Químico en ratones.

Se emplearon ratones machos de 25-30 gr de peso de la cepa local del I.F.C., U.N.A.M.

El Pentilentetrazol (Sigma) se disolvió en solución salina (0.8%), administrado por vía intraperitoneal (i.p.), empleando jeringas de tuberculina (Plastipak).

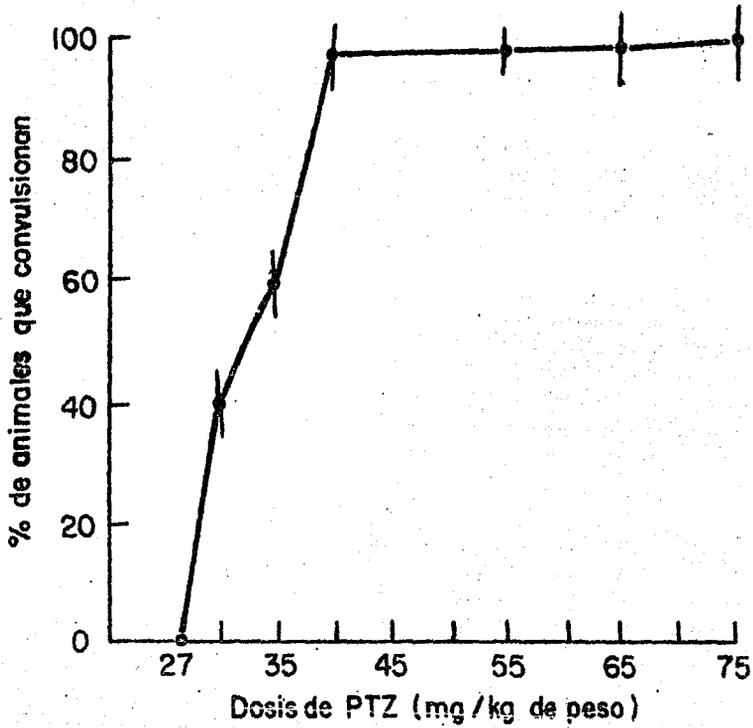
Para producir el Kindling Químico en ratones se inició por buscar la dosis ideal de Pentilentetrazol (PTZ) que cumpliera

con las características siguientes: la dosis empleada debería ser lo suficientemente baja para no producir la muerte del animal, pero suficientemente alta para producir gradualmente convulsiones tónico-clónicas (estado V descrito por Racine (19)). Esto se logró realizando tres curvas dosis vs respuesta:

La primera de las curvas, dosis de PTZ vs % de animales que presentan convulsión (gráfica 1).

PROCESO	SE OBTUVO
Raíz secada y molida -----	Polvo de la raíz
El polvo se coloca en agua en ebullición durante 3 Hs., después de las cuales se liofiliza -----	Liofilizado total
El polvo del liofilizado total es sometido a extracción con diferentes solventes para identificar los compuestos presentes.	
Hexano -----	Aceites
Cloroformo -----	Acido 3-hidroxi-4 metoxi sinámico
Acetato de Etilo -----	7-hidroxi-6 metoxi cumarina
Acetona -----	Escopoletina
Metanol -----	Extracto Metanólico
Butanol -----	Acetamida

Tabla I. Resumen de los extractos obtenidos de la raíz de *I. stans* y los solventes empleados durante este proceso.



GRAFICA 1. Porcentaje de ratones que presentaron convulsiones tónico-clónicas con respecto a la dosis de pentilentetrazol (PTZ) administrada. La dosis de PTZ se administró por vía intraperitoneal i.p., n=10.

La segunda curva, dosis de PTZ vs % de animales muertos por la convulsión (gráfica 2).

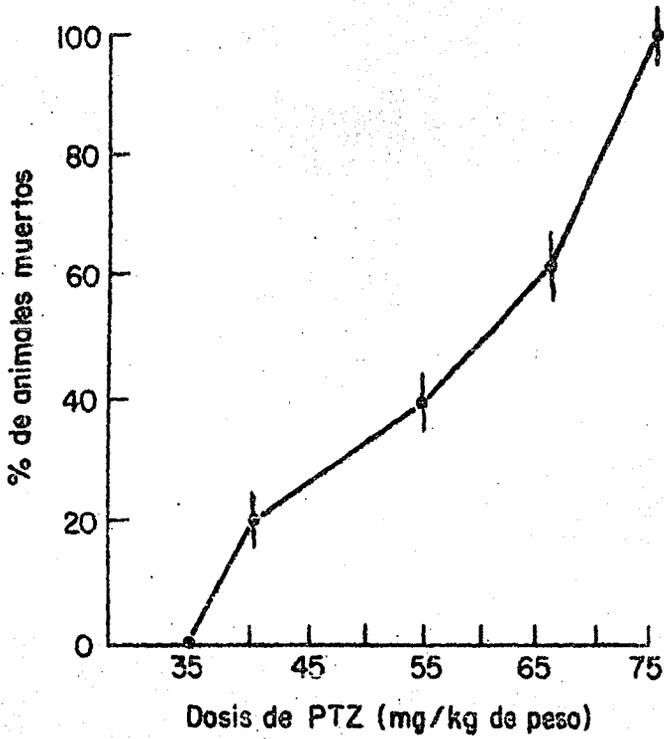
Finalmente, la tercera curva, dosis de PTZ vs latencia en la aparición de la primera convulsión (gráfica 3).

A partir de los datos obtenidos anteriormente (reunidos en la gráfica 4) se decidió utilizar la dosis de 27 mg/Kg peso de PTZ. Dicha dosis se administró diariamente entre las 8:00 y 10:00 horas, hasta producir un cuadro convulsivo generalizado en la mayoría de los animales. De estos se seleccionaron a los animales que presentaban el mayor número de convulsiones durante todo el tratamiento. A los animales seleccionados se les suspendió el tratamiento durante 5 días, al cabo de los cuales se reanudó dicho tratamiento, durante 5 días más. Los ratones que al final de los 5 días de tratamiento posterior a la interrupción del mismo, presentaron 5 convulsiones (una por día) fueron "seleccionados" para el experimento. Para determinar los probables efectos protectores de los extractos de la raíz de *I. stans* contra las convulsiones, estos se aplicaron a los ratones "seleccionados", entre 30 y 45 minutos antes de la inyección diaria de PTZ. Los controles para el experimento fueron, ratones que también desarrollaron Kindling, a los cuales se

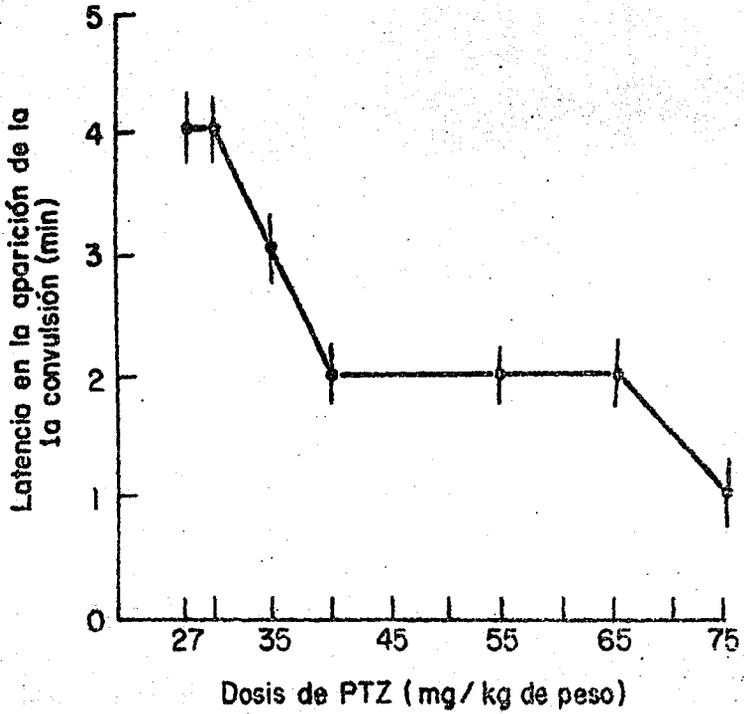
les administró solución salina 0.8%. Las dosis de los extractos fueron las mismas empleadas en el modelo agudo de convulsiones (31).

Los parámetros observados durante el experimento fueron los siguientes:

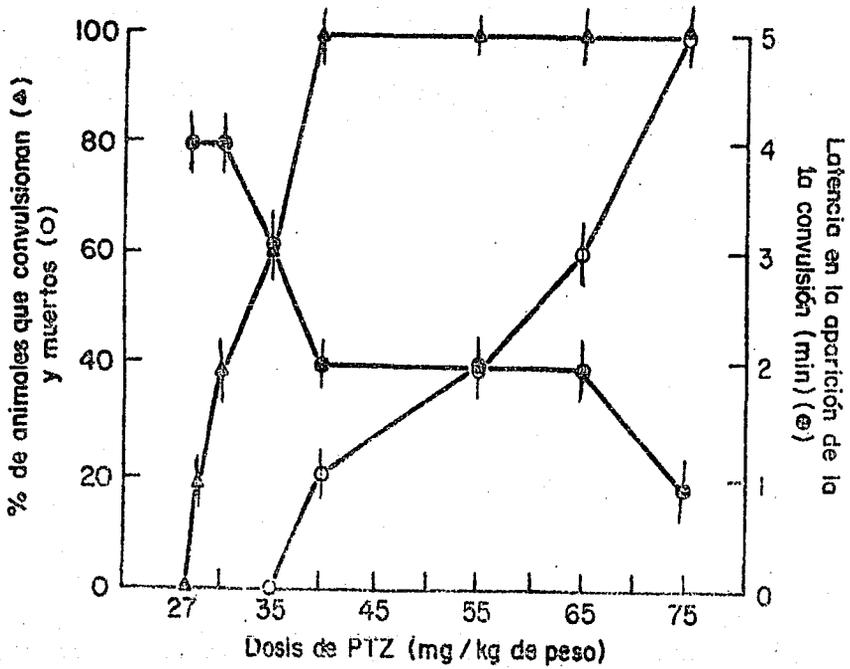
- a) Convulsiones.- Número de animales inyectados que presentaron convulsiones, estado V Racine (19).
- b) Latencia.- Intervalo entre el momento de la inyección de PTZ y la presencia de la primera convulsión (minutos).
- c) Número de convulsiones.- Número total de convulsiones tónico-clónicas presentadas por cada ratón durante el experimento.
- d) Mortalidad.- Número de animales muertos por la convulsión a lo largo del experimento (60 minutos).



GRAFICA 2. Porcentaje de animales muertos contra la dosis de PTZ, n=10.



GRAFICA 3. Latencia en la aparición de la primera convulsión contra la dosis de PTZ, n=10.



GRAFICA 4. Esta gráfica reúne los datos presentados por separado en las gráficas 1, 2 y 3. En la gráfica se observa como a una dosis de 27 mg/Kg de peso no se manifiestan crisis convulsivas y por consiguiente no presentando latencia en la aparición de la misma. Por lo tanto se considera a esta dosis como subconvulsiva o umbral, pues a partir de esta se empiezan a presentar crisis convulsivas, por lo cual esta dosis se considera ideal para desarrollar el Kindling.

4. RESULTADOS

4.1 Extractos obtenidos de la raíz de *Ipomoea stans*.

En la tabla I de la sección de MATERIAL Y METODOS, fue presentada la secuencia seguida para la obtención de los diferentes extractos, a partir de la raíz de *I. stans*. Brevemente se presenta a continuación la secuencia seguida para la obtención de los diferentes extractos probados en este trabajo.

El liofilizado total obtenido de la ebullición durante 3 horas del polvo de la raíz, fue disuelto en hexano para separar los aceites presentes de los demás componentes. El excedente de la extracción con hexano fue disuelto en acetato de etilo, el cual separó las cumarinas presentes. El siguiente paso en la extracción se realizó con acetona obteniéndose escopoletinas. Después de la obtención de la escopoletina, los residuos fueron sometidos a extracción con metanol presentándose en este extracto una gran variedad de compuestos. Finalmente, los residuos de la extracción con metanol se disolvieron en butanol obteniéndose acetamida.

4.2. Desarrollo del Kindling Químico en ratones.

La dosis subconvulsiva de PTZ obtenida de la gráfica 1 para el desarrollo del Kindling Químico fue de 27 mg/Kg peso. Como se observó en dicha gráfica dosis menores de 27 mg/Kg al ser administradas en una sola ocasión no produjeron convulsiones, sin embargo dosis por arriba de la anteriormente mencionada como es el caso de 28 mg/Kg peso produjeron crisis convulsivas en el 20% de los animales inyectados. Se puede apreciar también un aumento gradual en el % de animales que convulsionaron debido al incremento de la dosis inyectada de PTZ; así tenemos que con una dosis de 30 mg/Kg peso de PTZ un 40% de animales presentaron crisis convulsivas, con una dosis de 35 mg/Kg peso se observó el 60% y con dosis de 40 mg/Kg peso en adelante produjeron en el 100% de los animales crisis convulsivas.

Con los datos anteriores se pudo afirmar que 27 mg/Kg peso de PTZ es la dosis "umbral" en la aparición de crisis convulsivas por la administración única de PTZ.

Con respecto a la latencia en la aparición de la primera convulsión (gráfica 3) se observó que a dosis de 28 mg/Kg de PTZ, el tiempo transcurrido entre la inyección y los primeros síntomas de la convulsión fue de 4 minutos.

La misma latencia se hizo presente a dosis de 30 mg/Kg de PTZ. Se observó también que conforme se incrementó la dosis, la latencia disminuyó hasta presentarse en un minuto la crisis convulsiva, a una dosis de 75 mg/Kg de PTZ, la cual se consideró como dosis letal (18).

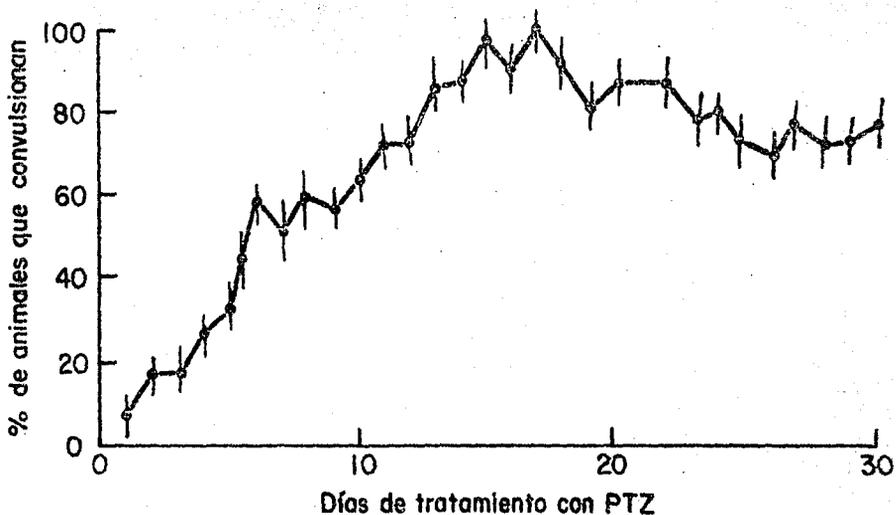
Por otro lado la gráfica 2 muestra el % de animales muertos durante el tratamiento. A partir de la administración de una dosis de 40 mg/Kg de PTZ se produjeron las primeras muertes en los ratones (20%). Conforme se incrementó la cantidad de PTZ administrado el % de animales muertos también aumentó hasta obtenerse un 100% en la mortalidad de los animales a una concentración de 75 mg/Kg de PTZ (dosis letal).

Cabe mencionar que las crisis convulsivas presentadas en los ratones durante la búsqueda de la dosis "umbral" fueron de tipo tónico-clónicas. Se iniciaba la crisis en forma clónica (estado III) y posteriormente pasaba a un estado tónico en la parte final de la convulsión (estado IV.) (Racine 19). En ocasiones un estado tónico prolongado durante la crisis convulsiva era el responsable de la muerte de los animales, cuando ésta se presentaba.

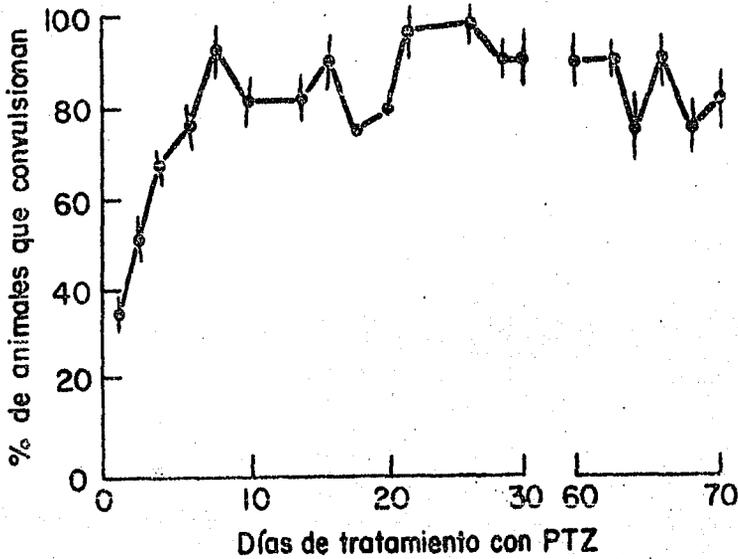
En la gráfica 4 se sobreponen las gráficas 1, 2, y 3 para hacer más evidente lo expresado anteriormente.

Una vez obtenida la dosis subconvulsiva de PTZ, esta

se administró a lotes de 20 ratones (ver material y métodos). Los datos obtenidos durante este tratamiento se muestran en la gráfica 5. En esta gráfica se muestra como conforme se incrementó el número de inyecciones recibidas por los ratones durante el tratamiento, se incrementó el % de animales que convulsionaron. De esta forma, la administración de una dosis que originalmente no producía convulsiones, al ser administrada crónicamente produjo daño progresivo y permanente en el sistema nervioso de los animales tratados.



GRAFICA 5. Desarrollo del kindling químico en ratones por inyección diaria de PTZ durante 30 días. En la gráfica se observa como el porcentaje en el número de animales que convulsionan se incrementa conforme el tratamiento se desarrolla, n=20.



GRAFICA 6. Desarrollo del kindling químico en ratones por la administración diaria de PTZ. En la gráfica se observa como el porcentaje en el número de animales que convulsionan se incrementa conforme se desarrolla el tratamiento de los animales por un lapso de 30 días, al cabo de los cuales el tratamiento se suspendió por espacio de 30 días, después del cual se reanudó. Se puede apreciar que pese a la interrupción del tratamiento el daño producido por la administración de PTZ es permanente. El número de animales para este experimento fue de 140. Cada punto es el promedio de 7 experimentos a lo largo del año.

Para corroborar que el tratamiento crónico de PTZ produjo un daño permanente en el sistema nervioso de los animales al desarrollar Kindling, se procedió a suspender el tratamiento. A un lote de animales que desarrollaron Kindling (30 días de tratamiento) se les suspendió el tratamiento durante 30 días. Después de 30 días de "descanso" se reanuda el tratamiento a los animales, apreciándose una respuesta inmediata (convulsiones) al estímulo (inyección de PTZ), pese al lapso transcurrido sin estimular. Esto confirma que el daño en el Sistema Nervioso producido por la administración de PTZ en forma crónica es permanente (gráfica 6).

Durante el desarrollo del Kindling se trataron lotes de ratones con solución salina como control para observar la variación en el peso de los animales, así como para tener la certeza de que las convulsiones se debían al daño producido por el PTZ en el Sistema Nervioso y no por la tensión nerviosa producida a los animales por la manipulación diaria, como lo sugiere Izquierdo. Gráfica 5 (37).

4.3 Efecto de la administración de los diferentes extractos de la raíz de *Ipomea stans* sobre las convulsiones presentadas en el modelo convulsivo de "Kindling Químico".

Se puede apreciar en las gráficas 7 y 8 los diferentes compuestos obtenidos a partir de la raíz de *I. stans* que fueron probados para determinar su posible acción anticonvulsivante López L. (31).

La gráfica 7 muestra la latencia en la aparición de la primera convulsión (en minutos). Se puede observar como el liofilizado total, del cual se extrajeron los diferentes extractos ensayados en este trabajo, fue el primer compuesto probado para determinar su acción anticonvulsiva. La dosis administrada fue de 200 mg/Kg de peso, presentando una latencia promedio en la aparición de la primera convulsión de 4 minutos.

La cumarina administrada a razón de 200 mg/Kg de peso no produjo efecto significativo en el retardo de la aparición de la primera convulsión con respecto al control.

La escopoletina obtenida de la extracción con acetato de etilo es un compuesto altamente hidrófobo, por lo que el vehículo empleado para administrarlo (en proporción de 200 mg/Kg peso) fue polietilenglicol (Baker). Por el hecho de emplear otro vehículo de administración diferente a la solución salina al 0.8%, se realizó un control del efecto del polietilenglicol sobre la latencia en la aparición de la primera convulsión (gráfica 8). En dicha gráfica se aprecia como el

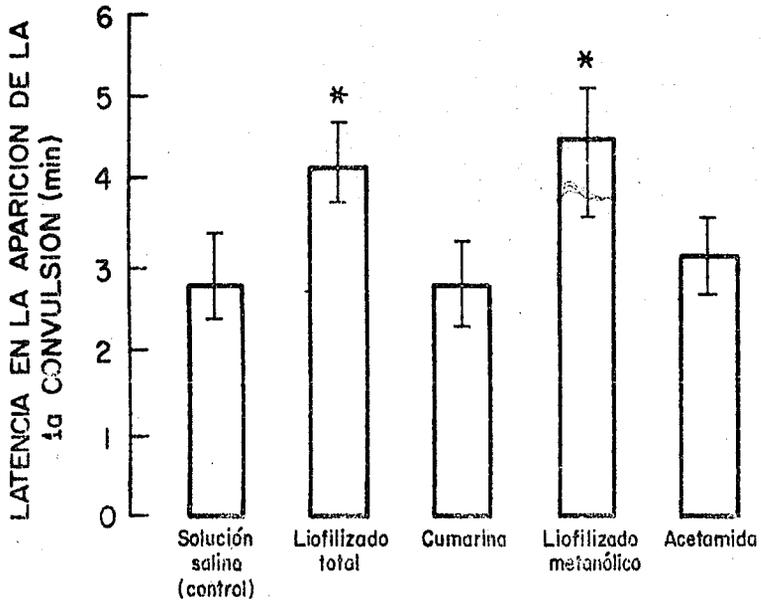
polietilenglicol por si solo produce una latencia en la aparición de la primera convulsión mucho mayor (6 minutos) que la presentada para solución salina (2.7 minutos). Sin embargo, al probar el efecto de la escopoletina sobre la disminución de las crisis convulsivas, la latencia presentada es menor (5.4 minutos), que la latencia control (6 minutos), concluyéndose que la escopoletina tampoco presentó propiedades anticonvulsivas.

Por lo que respecta al extracto metanólico de la raíz de *I. stans*, presentó una latencia promedio de 4.5 minutos en la aparición de la primera convulsión, lo cual apuntó a que el componente activo con propiedades anticonvulsivantes que originalmente se encontró presente en el liofilizado total se encontró presente también en este extracto.

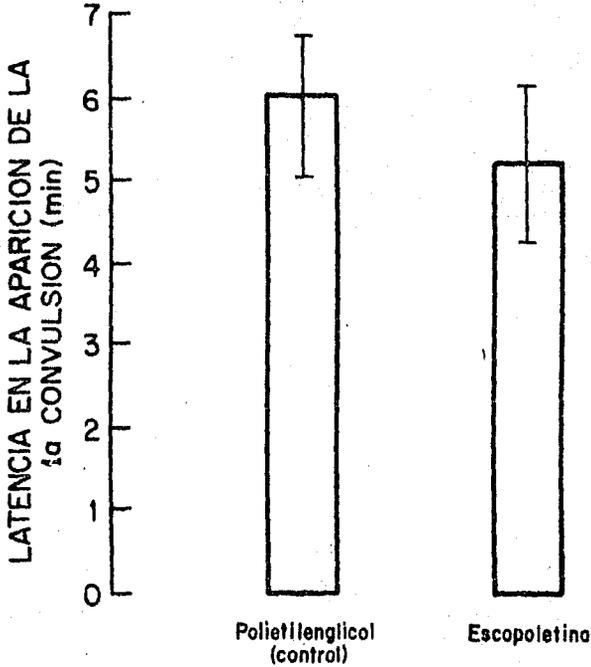
Para tratar de aislar el principio activo con propiedades anticonvulsivantes a partir del extracto metanólico, éste se sometió a extracción con butanol obteniéndose acetamida, la cual al ensayarse para conocer su poder anticonvulsionante en una concentración de 200 mg/Kg no presentó efectos significativos (gráfica 7).

Por lo que respecta al resultado de los parámetros, porcentaje de animales que convulsionan, número de convulsiones y mortalidad, fueron los siguientes: Al ser preseleccionados

los animales, suspendido y reanudado su tratamiento con PTZ, y de éstos se seleccionó a los animales para el experimento (ver material y métodos), el porcentaje de animales que convulsionó durante el experimento fue de 100%. El número de convulsiones durante el tratamiento fue de una, por lo que el número de convulsiones durante el experimento también fue de una. No presentándose mortalidad en los ratones durante el experimento.



GRAFICA 7. Esta gráfica presenta la latencia en la aparición de la primera convulsión de los diferentes extractos obtenidos de la raíz de *I. stans*. Los controles fueron inyectados con solución salina. Los niveles de significancia fueron calculados empleando la prueba estadística U-Mann Whitney $p < 0.01$ (*). Cada barra corresponde a lotes distintos cada uno con $n=10$, un solo experimento.



GRAFICA 8. Esta gráfica muestra la latencia en la aparición de la primera convulsión al probar la actividad anticonvulsivante de la escopoletina. Este compuesto por ser no polar se administró disuelto en polietilenglicol. Por esta razón se realizó un control con polietilenglicol para conocer su efecto sobre la latencia en la aparición de la crisis convulsiva. Los niveles de significancia fueron calculados empleando la prueba U-Mann Whitney $p < 0.01$ (*), $n=10$. Cada barra corresponde a lotes distintos, un solo experimento.

5. DISCUSION

En experimentos anteriores (31), se estudiaron los extractos obtenidos a partir de la raíz de *Ipomoea stans*, para intentar determinar la presencia de actividad anticonvulsivante como se había sugerido en estudios clínicos (22, 27, 28, 29). Inicialmente, los extractos fueron probados en un modelo convulsivo agudo (dosis letal, 75 mg/Kg de PTZ: 28). Los resultados obtenidos con este modelo convulsivo no fueron concluyentes pues el tiempo de aparición de la primera convulsión en este modelo convulsivo fue muy variable, no pudiendo diferenciar el retardo en la aparición de la primera convulsión debido al efecto anticonvulsivo de los extractos, o al tiempo que tarde el convulsivante en hacer efecto. Por esta razón se decidió probar los extractos al igual que el liofilizado total en otro modelo de convulsiones. Esta decisión se tomó en base a la necesidad de contar con un modelo de convulsión en el cual: 1) el tipo de convulsiones en ratones fuera lo más semejante a las producidas por un ataque epiléptico en humanos. 2) el tiempo de aparición de la convulsión a partir del estímulo desencadenante de esta, fuera conocido y controlado y 3) en el cual se

pudiera contar con un número significativo de sujetos de experimentación.

Se decidió desarrollar el Kindling Químico por ser un modelo convulsivo crónico. El desarrollo crónico del fenómeno lo equipara a la forma en la que se desarrolla la epilepsia. Otras de las ventajas en favor de este modelo convulsivo es que el Kindling Químico presenta un cuadro convulsivo muy semejante al presentado durante un ataque epiléptico (32).

Se ha logrado producir Kindling Químico en diferentes especies, ratas, gatos, monos, perros, conejos, cuyos y ranas. A pesar de esto, el número de animales disponibles para experimentación es en ocasiones de cuatro (35).

Se decidió emplear ratones para el desarrollo de Kindling, debido a que su mantenimiento, manejo y su facilidad para la observación durante el tratamiento permite determinar con mayor precisión si existe actividad anticonvulsivante en los extractos de la raíz de *I. stans* así como sus efectos colaterales.

Por el resultado del trabajo de López L. (31) probando estos extractos en modelos convulsivos agudos, en los que se empleó además de Pentilentetrazol, Picrotoxina y Tiosemicarbazida se sugiere que el mecanismo de acción del probable

anticonvulsivante no involucra al receptor postsináptico de GABA así como la síntesis de este neurotransmisor, pues no se observó ninguna variación en los tiempos de la latencia ni en el número de convulsiones producidas por estas drogas (28).

Johnson y Mitchell reportaron la disminución en la liberación de GABA en rebanadas de corteza cerebral de rata inducida por PTZ. Este es posiblemente uno de los mecanismos de acción de PTZ por el cual produce crisis convulsivas, a través de la disminución en la liberación de GABA. Otro de los efectos producidos por PTZ es el aumento en la excitabilidad neuronal, independientemente del efecto del GABA. Cabe mencionar que el mecanismo de acción mediante el cual el PTZ produce crisis convulsivas aún no es conocido.

Se considera que la forma de actuar de los anticonvulsivantes es mediante la acción antagonista o bloqueando el efecto convulsivo, de manera que una vez realizada esta acción, tenga la capacidad de revertir este efecto. Es probable que las causas de las crisis convulsivas en este modelo se deban al daño producido por PTZ sobre el sistema gabaérgico, por lo que el mecanismo de acción de la o las sustancias presentes en el o los extractos deberán actuar sobre este sistema.

No se descarta la posibilidad de que la acción anti-convulsiva de estos extractos se deba a que interfieren en la velocidad normal de la absorción del PTZ. Ya sea, del peritoneo al torrente sanguíneo o del torrente sanguíneo hacia el tejido nervioso, siendo este el motivo por el cual se incrementa la latencia en la aparición de la convulsión.

Al probar los diferentes compuestos a partir de la raíz de *I. stans* sólo se observó un incremento en la latencia de la aparición de la primera convulsión en dos de los extractos, gráficas 7 y 8. Estos compuestos fueron el liofilizado total gráfica 7, el cual en si mismo contiene a todos los demás compuestos, y el extracto metanólico gráfica 8.

Cuando se llevó a cabo la administración de PTZ para determinar la actividad anticonvulsivante del liofilizado total se observó un aumento en la latencia de la aparición de la primera convulsión de 4 minutos, minuto y medio de latencia más con respecto al control. Los datos de la literatura señalan como agentes anticonvulsivantes a los que llegan a aumentar de un 10 a 80% la latencia de la aparición de la primera convulsión (22, 32). Dado que el liofilizado total aumentó un 60% la latencia en la aparición de la primera convulsión, sugiere efecto anticonvulsivo, contra la administración de PTZ.

Al probar el extracto metanólico este presentó una latencia de 4.5 minutos, dos minutos de latencia más con respecto al control, lo que equivale a un aumento de 80% en la latencia de la aparición de la primera convulsión, por lo que también presentó efecto anticonvulsivante.

El extracto metanólico fue sometido a cromatografía de capa fina, eluyendo con butanol-ácido acético-agua (5:1:4, v/v) obteniéndose 5 manchas. La mancha correspondiente al Rf 0.15 dio prueba positiva para alcaloides. Este alcaloide fue identificado como 7-hidroxi, 6-metoxi, cumarina, por lo que se pensó que este era el componente que proporcionaba la actividad anticonvulsiva al extracto metanólico. Al probar la actividad anticonvulsiva de este compuesto en los ratones, presentó una latencia en la aparición de la primera convulsión igual a la presentada por el grupo control (2.5 minutos).

Al separar los compuestos presentes en el extracto metanólico se obtuvo acetamida (empleando Hexano como disolvente). Al probar este compuesto no presentó efecto anticonvulsivante. Esto nos indica que el componente activo presente en el liofilizado total y presente también en el extracto metanólico no era la Acetamida. Cabe mencionar que el uso de Polietilenglicol por sí mismo produce una latencia

mayor en la aparición de la primera convulsión, sin embargo la latencia presentada por la Acetamida no es estadísticamente significativa.

La presencia de 6-metoxi, 7-hidroxi cumarina en el extracto total es de importancia si consideramos que presenta una estructura semejante a la de las furocumarinas que han sido reportadas con propiedades anticonvulsivas (22, 27, 28, 31). Si consideramos que tanto la acetamida como la cumarina no presentaron un incremento significativo en la latencia de la aparición en la crisis convulsiva, es probable que estos compuestos no actúan individualmente. En base a los resultados obtenidos probablemente estos compuestos presentan efectos anticonvulsivos en combinación con uno o más compuestos que aún no han sido identificados, pero presentes tanto en el liofilizado total como en el extracto metanólico.

Aún no se puede identificar cual es el o los componentes activos involucrados en la acción anticonvulsiva de *I. stans*. Por lo que se debería seguir buscando este o estos compuestos partiendo de la base de que dicho componente se encuentra presente en el extracto metanólico y no es la acetamida o la cumarina ya que individualmente no presentan efectos significativos.

Con estos experimentos, no podemos delimitar la actividad

anticonvulsivante de los extractos de la raíz de *I. stans* por lo que se requieran estudios subsecuentes, tales como: Medir la concentración de PTZ en el cerebro antes y después de la aplicación de los compuestos anticonvulsivos. Con lo anterior se descartaría la posible acción de estos compuestos sobre la velocidad de absorción de PTZ en el organismo. Aislar todos los componentes presentes en el extracto metanólico y probar su actividad anticonvulsivante "*in vivo*", tanto individualmente como combinados.

Por otro lado Jhonson y Col. (15) reportaron que la aplicación de PTZ produce una disminución en la liberación de GABA en rebandadas de corteza cerebral de rata. Esto nos brinda otro modelo para probar el extracto metanólico así como los diferentes componentes de este "*in vitro*". El o los componentes con propiedades anticonvulsivantes deberán ser capaces de revertir el efecto producido por PTZ y probablemente favorezcan la liberación de GABA disminuida por PTZ.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Lara, R., Sandoval, M.E. (1981). The neurosciences, experimental and theoretical approaches cognition and brain theory. 5 (2): 58-72.
2. Sandoval, M.E. y Lara, R. (1983). Propiedades generales de la transmisión sináptica. En: Pasantes-Morales H. y Aréchiga H. (Eds.). Aminoácidos y péptidos en la integración de funciones nerviosas, U.N.A.M. México. pp. 19-29.
3. Feria, A., Tapia, G. (1986). Estructura de los elementos tisulares centrales que intervienen en el fenómeno convulsivo. En: Feria Velasco, A., Martínez de Muñoz, D. y Rubio, F. (Eds.). Epilepsia, un enfoque multidisciplinario. Ed. Trillas, México. pp. 28-73.
4. Eccles, J. C. (1964). The physiology of the synapsis. Springer Verlag. Berlin.
5. Kandel, E. R. (1977). Cellular basis of behavior: An Introduction to behavior al neurobiology, E.H. Fresman Co. San Francisco. Cap. 11-13.
6. Palay, S. L. (1958). The morphology of synapsis in the central nervus system. Exp. Cell. Res. sup. 1 (5): 275-293.
7. Gray, E. (1959). Axo-somatic and Axo-dendritic synapsis of the cerebral cortex: An electron microscope study. J. Ant. Lond. 93: 420-453.

8. Llinás, R. y Steinberg, I. (1976). Presynaptic calcium currents and their relation to synaptic transmission. Voltage clamp study in squid giant synapses and theoretical model for the calcium gate. Proc. Nat. Acad. Sci. 873: 2918-2922.
9. Hamerslag, R. y Roberts, E. (1972). Overview of chemical transmission. En: Basic Neurochemistry, Siegel B.D. Wayne, R. y Agranoff, G. (Eds.). Little Brown and Co. Boston, 167-179.
10. Rubio, F. (1986). Generalidades y clasificación de la epilepsia. En: Feria Velasco, A., Martínez de Muñoz, D. y Rubio, F. (Eds.). Epilepsia, un enfoque multidisciplinario. Ed. Trillas, México. 19-27.
11. Sandoval, M. E. y Torner, C. (1986). Neurotransmisión y epilepsia. En: Feria Velasco, A., Martínez de Muñoz, D. y Rubio, F. (Eds.). Epilepsia, un enfoque multidisciplinario. Ed. Trillas, México. 98-139.
12. Solís, H. y Arauz, C. (1986). Modelos experimentales de epilepsia. En: Feria Velasco, A., Martínez de Muñoz, D. y Rubio, F. (Eds.). Epilepsia, un enfoque multidisciplinario. Ed. Trillas, México. 74-139.
13. Purpura, D.P. y Woodbury, D. (1972). Experimental models of epilepsy. Raven Press, Nueva York.
14. Lundh, N. (1978). Effect of 4-Aminopyridine in neuromuscular transmission. Brain Res. 153: 307-318.

15. Johnson, G. y Mitchell, J. F. (1971). The effect of Bicuculline, metrazol, picrotoxine and strychnine on the release of 3H-GABA from brain slices. *J. Neurochem.* 18: 2441-2446.
16. Goodman, L. S. y Gilman, A. (1979). *Bases farmacológicas de la terapéutica, Convulsivantes*, 2a. edición UTHEA. México.
17. Goddard, G. (1967). Development of Epileptic Seizures through brain stimulation at low intensity. *Nature.* 214 (3): 1020-1021.
18. Ito, T. (1977). Effect of anticonvulsivants on seizures developing in the course of daily administration of pentilentetrazol to rats. *European J. Pharmacol.* 45: 165-172.
19. Racine, R. (1972). Modification of seizure activity by electrical stimulation. *Clin. Neurophysiol.* 52: 269.
20. Wada, J. y Sato, M. (1974). Generalized convulsive seizures induced by daily electrical stimulation of the amigdala in cats. *Neurol.* 24: 565-574.
21. Carbajal, G., Rusek, J., Tapia, R. y Massieu, G. (1964). Anticonvulsive action of substances designed as inhibitors of GABA transmitters. *Biochem. Pharmacol.* 13: 1059-1069.

22. Russinov, K. (1968). Effect of Furotumarins on the nervus system. Bolletin of Institute of Physiology. Vol. XI, Bulgaria.
23. Masland, R. (1974). Clasificación de the epilepsies. En: Handbook of Clinical Neurology. Amsterdam North Holland Publishing Co. Vol. 15.
24. Commission on clasificación and terminology. En: International league against epilepsy. Epilepsia. (24): 480-501.
25. Merlis, J. (1970). Proposall for an international clasificación of the epilepsy. Epilepsia (11): 114-119.
26. Jackson, J. (1931). Selected writings of H. Jackson. En: Epilepsy and epileptiform convultions. Taylor J. Londres; Hodder and Staghton. Vol. 1.
27. Jaúregui, F. (1986). Estudio de algunos purgantes indigenas. La naturaleza. Tomo VII. México.
28. Solís, R. (1932). El shock producido por la fracción activa del tumbavaqueros (I. *stans*). Tesis profesional. Facultad de Medicina, U.N.A.M. México.
29. Hernández, U. (1932). Contribución al estudio del tumbavaqueros (I. *stans*). Tesis profesional. Facultad de Medicina, U.N.A.M. México.

30. Matuda, E. (1963). El genero, *Ipomoea* en México. *Anales del Instituto de Biología*. Tomo XXXIV. Núm. 1. pp. 102. México.
31. López, L. (1982). Estudio de *I. stans*, una planta con posible actividad anticonvulsiva. Tesis profesional. Facultad de Ciencias, U.N.A.M. México.
32. Arzate, V. (1981). Interacción Taurina-Calcio: Posible mecanismo de la acción anticonvulsiva de la Taurina. Tesis profesional. Facultad de Ciencias, U.N.A.M. México.
33. Gaito, J. (1980). Effect of variable duration one hertz interference on Kindling. *Canadian Journal of Neurological Sciences*. 7 (1): 59-64.
34. Curtis, R. (1972). Convulsive action of penicillin. *Brain Research*. (43) 242-245.
35. Marescaux, C. 1984. A model of chronic spontaneous Petit Mal like Seizures in the rat with PTZ-induced Seizures. *Epilepsia*. 25 (3): 326-331.
36. Diehl, R. (1984). Development and persistence of kindled seizures effect repeated injeccion of PTZ in rats and Guinea pigs. *Epilepsia*. 25 (4): 506-510.
37. Izquierdo, I. (1975). Effect of daily saline, drug or blank injection on the susceptibility to the convulsant effect of drugs. *Pharmac. Biochem*. 3 (4): 721-722.

38. Martínez, D. (1983). Papel de los neurotransmisores en la epilepsia. En: Aminoácidos y péptidos en la integración de funciones nerviosas. Pasantes, H. y Aréchiga, U. (Eds.). U.N.A.M. México. 141-157.
39. Martínez, D. (1986). Modelo de acción de algunos fármacos antiepilépticos. En: Feria Velasco, A., Martínez de Muñoz, D. y Rubio, F. (Eds.). Epilepsia, un enfoque multidisciplinario. Ed. Trillas, México. pp. 140-167.
40. Pellmar, T. C. (1977). Synaptic mechanism of pentilene-tetrazole selectivity for chloride conductance. *Science*. 197: 912-913.
41. Vindrola, O., Briones, R., Asai, M., Fernández-Guardiola, A. (1981). Brain content of Leu- and Met-Enkephalin changes independently during the development of kindling in the rat. *Nsc. Letters*. (26): 125-130.
42. Engel, J. y Sharpless, N. S. (1977). Long-lasting depletion of Dopamine in the rat amigdala induced kindling stimulation. *Brain Res*. (136): 381-386.
43. Byrne, M. C., Gottlieb, R. y McNamara, J. O. (1980). Amigdala kindling induces muscarinic cholinergic receptor declines in a highly specific distribution within the limbic system. *Exp. Neurol*. (69): 85-98.
44. McNamara, J. O. (1978). Selective alterations of regional β -adrenergic receptor binding in the kindling model of epilepsy. *Exp. Neurol*. (61): 582-591.

45. Schulz, D. W. y Macdonald, R. L. (1981). Barbiturate enhancement of GABA-mediated inhibition and activation of chloride ion conductance: Correlation with convulsant and anesthetic. *Brain Res.* 209: 177-188.
46. Mc Canless, W. y Dworsky, S. (1987). Pentilentetrazole induced changes in cerebral energy metabolism in *Tupaia Glis*. *Epilepsia* 28 (2): 184-189.
47. Piredda, S. y Yonekawa, W. (1985). Potassium, pentilentetrazole and anticonvulsants in mouse hippocampal slices. *Epilepsia*. 26 (2): 167-174.
48. Parmas, J. y Flanchs, H. (1980). Psychopharmacological aspects of antiepileptic treatment. *Progress in Neurobiology*. 15: 119-138.