

T
227

84389

T/227

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS.

Maestría en Ciencias Farmacéuticas
Línea de investigación Fitofarmacológica

**“ESTUDIO DE LA POSIBLE ACTIVIDAD
ANTICONVULSIVA DE LOS EXTRACTOS ACUOSO Y
ALCOHÓLICO DE LA VALERIANA EDULIS SSP
PROCERA”**

Comunicación idónea de resultados que para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

presenta:

Francisco López Naranjo
Matrícula 99182184

Tutor: Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda (INNN, UAM-X)
Asesoras: M. en C. Teresa Izquierdo Sánchez (UAM-X),
Dra. Irma Rojas Oviedo(UAM-X).

México, D.F.

Marzo del 2001

Agradecimientos

A *Díos* por haberme dado la vida y todas las bendiciones recibidas.

A mis padres María Paula y Daniel Francisco por su apoyo comprensión, buen ejemplo y cariño incondicionales.

A Judith Angélica y Oscar Daniel por su cariño, apoyo, sacrificio y comprensión.

A los asesores de mi comité tutorial: Dr. Camilo Ríos C., M. en C Teresa Izquierdo S., Dra. Irma Rojas O., Dr. Joaquín Manjarrez M., Dr. Reyes Haro V. por su apoyo en la realización de este trabajo.

A toda mi familia quienes siempre me han mostrado su confianza y apoyo incondicionales

CONTENIDO

		PÁG.
I.	ANTECEDENTES	5
	• Justificación	8
II.	MARCO TEORICO	9
	• Fitofármacos	9
	• Epilepsia	10
	Neurotransmisión	
	• Epilepsia y embarazo	14
	• Antiepilépticos	16
	• Clasificación de los fármacos antiepilépticos	18
	• Interacciones de algunas sustancias con los anticonvulsivos	19
	• Estudios preclínicos	22
	• Terapias alternativas	24
	• Relevancia de nuevas fito-medicinas en el campo de la terapéutica	26
	Partes utilizadas de las plantas	
	• Descripción etnobotánica del género <i>Valeriana</i>	27
	Familia valereanacea	
	Diversas especies del género <i>Valeriana</i>	
	La <i>Valeriana officinalis</i>	
	Ubicación taxonómica de la <i>Valeriana edulis ssp procera</i>	
	Fitoconstituyentes de la <i>Valeriana edulis</i>	
	Actividad Farmacológica	
	Dosis recomendadas	
	Efectos adversos de <i>Valeriana edulis</i>	
	• Acido Valpróico	33
	Propiedades fisicoquímicas	
	Farmacocinética	
	Usos	
	Efectos adversos	
	• Alcohol etílico	35
	• Pentilentetrazol (metrazol)	36
	Mecanismo de acción	
	• Generalidades de la evaluación preclínica y clínica en estudios de toxicidad	38
	Investigación preclínica (estudios controlados en animales)	
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	42
IV.	OBJETIVOS	43

V.	METODOLOGÍA	44
	<ul style="list-style-type: none"> a) Preparación de extractos b) Ensayo con PTZ para determinar la actividad anticonvulsiva de los extractos c) Ensayo de desplazamiento de la actividad locomotriz ambulatoria d) Fraccionamiento parcial e) Análisis cromatográfico f) Análisis estadístico de los resultados de cada uno de los ensayos anteriores 	
VI.	RESULTADOS	47
	<ul style="list-style-type: none"> • Curva dosis efecto de la <i>Valeriana edulis</i> • Estudio preliminar del efecto anticonvulsivo de los extractos del rizoma de la <i>Valeriana edulis</i> • Actividad anticonvulsiva de los extractos de <i>Valeriana edulis</i> • Número de crisis convulsivas del EA de <i>Valeriana edulis</i> • Efecto del EA de <i>Valeriana edulis</i> sobre la latencia de la primera crisis convulsiva • Duración de las crisis convulsivas EA de <i>Valeriana edulis</i> • Porcentaje del efecto del EA de <i>Valeriana edulis</i> sobre la letalidad del PTZ • Latencia 1ª crisis convulsiva EHE de <i>Valeriana edulis</i> • Número de crisis convulsivas EHE <i>Valeriana edulis</i> • Duración de las crisis (min.)EHE <i>Valeriana edulis</i> • Porcentaje de letalidad EHE <i>Valeriana edulis</i> • Evaluación de la toxicidad neuro motriz de los EA del rizoma de <i>Valeriana edulis</i> • Desplazamiento horizontal EA <i>Valeriana edulis</i> • Desplazamiento vertical EA <i>Valeriana edulis</i> • Desplazamiento ambulatorio EA <i>Valeriana edulis</i> • Evaluación de la toxicidad neuro motriz de los EHE del rizoma de <i>Valeriana edulis</i> • Desplazamiento horizontal EHE <i>Valeriana edulis</i> • Desplazamiento vertical EHE <i>Valeriana edulis</i> • Desplazamiento ambulatorio EHE <i>Valeriana edulis</i> • Análisis cromatográfico • Fraccionamiento parcial del EA del rizoma de la <i>Valeriana edulis</i> y su evaluación farmacológica 	

- Fraccionamiento parcial: Latencia 1^a crisis
- Fraccionamiento parcial: Número de crisis
- Fraccionamiento parcial: Duración de crisis
- Fraccionamiento parcial: Porcentaje del efecto anticonvulsivo

VII.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	68
VIII.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	69
IX.	CONCLUSIONES	72
X.	BIBLIOGRAFÍA	74

I ANTECEDENTES

Desde tiempos inmemorables la humanidad ha sufrido diversos tipos de padecimientos, en el siglo V A.C., Hipócrates ya definía a la Epilepsia como un trastorno cerebral; pero fue hasta 1930 cuando se estableció la correlación entre las crisis epilépticas y las descargas eléctricas excesivas a nivel neuronal (1).

Al inicio del tratamiento de este trastorno, aproximadamente en el 80% de los casos de epilepsia la etiología era desconocida, lo que se sabía estaba en función de los síntomas de los pacientes con registros electroencefalográficos. Al paso del tiempo la experimentación farmacológica ha permitido obtener distintos medicamentos antiepilépticos.

Actualmente la epilepsia se define como una afección crónica de etiología diversa caracterizada por crisis recurrentes debidas a descargas eléctricas excesivas ocasionando un desorden en la neuronas cerebrales (2,3), en donde el cuerpo capta señales erróneas en su funcionamiento y por lo tanto se producen los ataques (crisis epilépticas) que se caracterizan por los súbitos cambios en las ondas eléctricas cerebrales, provocando a veces que el paciente mire fijamente “crisis de ausencia” o “pequeño mal” (pérdida de la conciencia); se puede presentar la caída de la persona, rigidez, temblor del cuerpo y sacudidas involuntarias de las extremidades (mioclonus) “gran mal” o “tónico clónico”, el cual aparentemente es más frecuente en hombres que en mujeres (4).

Las crisis convulsivas se dividen en parciales y en generalizadas, cuando están relacionadas con una localización anatómica cerebral se denominan parciales: (idiopáticas, sintomáticas, criptogénicas), y cuando no se tiene localizado el foco epileptógeno se denominan crisis convulsivas generalizadas de acuerdo con la

Clasificación Internacional de Crisis Epilépticas de 1981: (2,4).

- crisis parciales (comienzo focal)
 - crisis parciales simples .
 - crisis parciales complejas.
 - crisis parciales que evolucionan a generalizadas tónico-clónicas.
- crisis generalizadas (convulsivas o no convulsivas):
 - crisis de ausencia típica.
 - ausencias típicas.
 - crisis mioclónicas.
 - crisis clónicas.
 - crisis tónicas.
 - crisis tónico-clónicas.
 - crisis atónicas.
- crisis no clasificadas

La naturaleza y la duración de los crisis convulsivas varían según el tipo de epilepsia (5,6,7).

La Etiología de la epilepsia es diversa (en la actualidad las causas son conocidas en un 85 %) (4) y se podría deber entre otras causas a un fuerte golpe en la cabeza (traumatismo cráneo encefálico), infecciones (inflamación de las meninges), tumores, arterioesclerosis, enfermedades parasitarias (cisticercosis), problemas durante el nacimiento (cianosis, hipoxia cerebral), enfermedades congénitas, abuso de alcohol. Existen diversos factores que pueden desencadenar una crisis epiléptica: como son las luces intensas que se encienden y apagan, cansancio excesivo, alteraciones metabólicas, traumatismos, un sonido muy intenso, la falta o suspensión de la terapéutica medicamentosa, etc. (3,4).

En México, los datos epidemiológicos consultados acerca de esta neuropatología son incompletos o en ocasiones poco concordantes, ya que no se le ha dado el debido seguimiento por parte de nuestras autoridades sanitarias; esta revisión indica que en nuestro país se reconoce un alto índice de prevalencia (número total de casos en una población en riesgo) de trastornos epilépticos tanto en niños como en adultos de todas las clases sociales (6,8). Se detecta con más frecuencia en niños y jóvenes, tiende a disminuir en los adultos y aparentemente no hay diferencia de género. Se han realizado algunos estudios epidemiológicos en áreas urbanas, suburbanas y rurales en diversas partes de la República Mexicana, dando como resultado que en la actualidad más de un millón de mexicanos (1% de nuestra población) padecen alguna forma de epilepsia y de ellos solamente 1-2 % están bajo supervisión médica continua, por lo tanto se puede decir que este padecimiento neurológico es un problema de salud pública, aunque su tasa de mortalidad es baja (5,6,7,52).

Existen reportes que indican que muchos de estos pacientes son resistentes a los tratamientos médicos convencionales (mono y politerapia), ya que padecen epilepsia refractaria (resistente al tratamiento) y esto conlleva a que se presenten algunos efectos adversos como: alteraciones cognitivas o de desarrollo personal, ocasionados por el uso de los antiepilépticos típicos, convirtiéndose así en candidatos a cirugía. Pueden también modificarse los niveles hormonales de las mujeres que padecen epilepsia y presentar cuadros de amenorrea, hiperprolactinemia funcional, ovarios poliquísticos, existen factores biológicos y genéticos, etc. (6,72).

Por lo tanto, es relevante abordar el estudio de nuevos compuestos eficaces en la terapéutica del control de las crisis convulsivas, que ofrezcan ventajas en comparación con los que actualmente se encuentran en el mercado.

Entre los fármacos depresores del SNC relativamente nuevos se encuentran los fitoterapéuticos, entre ellos los obtenidos del género *Valeriana* del cual se han identificado más de 350 especies como son la *Valeriana officinalis* (variedad europea) y la *Valeriana edulis subespecie procera*, *Valeriana toluicana D.C.*, *Valeriana vaginata H.B.K.*, *Valeriana scorpioides* (especies mexicanas) (19).

De algunas de ellas se conoce su eficacia farmacológica ya que se han planteado estudios experimentales preclínicos en modelos antiespasmódicos, ansiolíticos, de motilidad, de agresividad, de privación de sueño, etc. (119,160).

Los modelos fisiológicos experimentales constituyen una aproximación a la problemática de la extrapolación farmacocinética entre un modelo animal y el ser humano, estos modelos se basan en datos anatómicos y fisiológicos que permiten una predicción de los niveles que alcanzará el fármaco y/o los principios bioactivos en los principales órganos y tejidos del organismo humano sano y enfermo, por lo tanto los estudios clínicos se diseñan a largo plazo y con doble ciego, para demostrar en el ser humano su actividad biológica de tipo ansiolítica, tranquilizante, hipnótica, hipotensora, antiespasmódica, etc. (9,12).

Como ya se ha reportado un punto importante en el desarrollo de un fármaco y/o fitofármaco antiepiléptico, es elegir el modelo animal idóneo para los estudios preclínicos, principalmente se seleccionan mamíferos que presenten manifestaciones eléctricas y conductuales semejantes a las humanas (12), lo que permite estudiar los mecanismos neuronales relacionados con la regulación de la excitabilidad del Sistema Nervioso Central (SNC) (13).

Justificación

Debido a que la epilepsia es un problema de salud pública muy importante en México y presenta múltiples situaciones de complejidad e interés, es importante realizar estudios para evaluar la actividad antiepiléptica de productos etnobotánicos, que sirvan como tratamientos terapéuticos alternativos.

En el presente proyecto se estudia el efecto anticonvulsivo de la *Valeriana edulis ssp. procera*, especie silvestre ampliamente utilizada en nuestra medicina tradicional, para determinar su posible aplicación en casos leves o iniciales de algún tipo de epilepsia (crisis de ausencia).

La diversidad vegetal de México se considera como una de las más variadas del mundo, debido a su privilegiada ubicación geográfica y condiciones ambientales, como: clima, suelo y topografía (14,149). La producción de plantas medicinales ha sido una de las actividades agrícolas menos desarrolladas a pesar de la gran tradición etnobotánica de los jardines botánicos prehispánicos ya que nuestro país cuenta con una gran riqueza y tradición herbolaria, heredada de nuestros ancestros (curanderos, yerberos, chamanes etc.) (15,16,17), los cuales identificaban, recolectaban y empleaban una gran diversidad de productos de origen vegetal (94), tal como es el caso de la *Valeriana edulis*: usada en casos de histeria, insomnio, cefaleas intensas, neurosis, palpitaciones cardíacas, migraña, espasmos musculares, dismenorrea, menopausia e hipocondriasis; se le han atribuido efectos sedantes, hipnóticos, antiespasmódicos, ansiolíticos, y antiepilépticos (14). Dicha especie no ha sido tan estudiada de manera sistemática como la *Valeriana officinalis* (18), siendo aquí donde radica la importancia y la aportación del presente estudio.

Con el paso del tiempo y los avances científicos se han podido identificar de manera sistemática los productos naturales con propiedades medicinales (19). Gracias a estos logros se han podido analizar, identificar y caracterizar un sin número de principios bioactivos contenidos en las plantas. Los productos de origen natural han sido utilizados ancestralmente de manera empírica, siendo necesario establecer registros de la terapéutica tradicional popular. En la actualidad las plantas medicinales son utilizadas de manera rutinaria para la preparación de tinturas, elixires, extractos y concentrados medicamentosos con actividad ansiolítica. A pesar de ello el interés de las compañías farmacéuticas ha sido limitado (20).

II MARCO TEÓRICO

Fitofármacos

Un fitofármaco (fito = planta o vegetal, fármaco = sustancia con fines terapéuticos) (150) se define como: sustancia activa con propiedades terapéuticas contenida en las plantas medicinales (20,21). Fitofármaco también está definido como: hierba utilizada con fines medicinales (151).

Los reportes de las posibilidades de empleo de los fitofármacos en la medicina hospitalaria son limitadas por falta de información dentro del ámbito científico, debido en primera instancia, al tipo de enfermedades (agudas) que requieren de un tratamiento intensivo. Los fitofármacos no se consideran como medicamentos para tratamiento en trastornos agudos o de urgencias (20,21). Sin embargo en los últimos años los fitofármacos han crecido dentro del marco de la terapia medicamentosa y tienen cada día mayor relevancia (22,23,24); el naturismo se basa en el supuesto de que es posible por medios naturales ayudar al organismo a recuperar el equilibrio perdido que le ha conducido a alguna enfermedad, ya sea por causas externas o por alteraciones producidas en el propio cuerpo (25).

Se siguen realizando investigaciones de plantas que proporcionen efectos curativos sobre determinadas patologías, que no produzcan en el individuo tantos y tan acentuados efectos adversos como las prescripciones alópatas, y sean de gran eficacia terapéutica (26,27).

Se ha venido dando un repunte en los últimos años acerca del empleo de los productos de origen natural en la terapéutica medicamentosa especialmente en Norte América en donde en 1991 el 3% de la población recurrió a estos tratamientos y en 1998 lo hizo un 37% de la población y el mercado de estos productos alcanzó aproximadamente 3 billones de dólares al año (157), lo que le da un nuevo enfoque e interés a la fitoquímica (aislamiento, identificación de metabolitos secundarios de los extractos activos por medio de ensayos biodirigidos) (21,94).

En búsqueda de la seguridad y eficacia de fitofármacos, se ha venido evaluando y estableciendo el perfil farmacológico de especies reconocidas en la tradición herbolaria con la que contamos en el país, desde muy diversos puntos de vista como son el costo-beneficio, riesgo-beneficio, efectividad terapéutica, idiosincrasia, tradición cultural, etc. (21).

Algunas de las principales indicaciones de empleo racional de los fitofármacos son: enfermedades respiratorias, circulatorias periféricas, digestivas, urogenitales, cutáneas, psicovegetativas, y trastornos del funcionamiento cerebral (Epilepsia).

Como ejemplos de fitofármacos con efectos anticonvulsivos se han reportado: *Albizzia lebeck*, *Hibiscus rosa sinesis*, *Butea monosperma*, *Lavandula stoechas L*,

Afronosia laxifolia, Gastrodia elata BI, Magnolia grandifolia, Valeriana officinalis, Valliarifolia, Psidium guayanensis, Passiflora incarbata, etc. (10,28,29,30,31,32,33).

Los fitofármacos se pueden preparar a partir de:

- a) Las partes vegetales cortadas y pulverizadas.
- b) Los jugos de las plantas.
- c) Las tinturas, las maceraciones en aceite y los productos destilados.
- d) Los extractos obtenidos con solventes de las diferentes partes de las plantas. (21,27).

Los fitofármacos como terapia alternativa son más baratos que los medicamentos sintéticos; se está regulando su uso para garantizar su valor terapéutico, la seguridad, su eficacia y el grado de toxicidad (34,35).

Epilepsia

Existen diversos reportes médicos que describen a la epilepsia como un desorden neurológico el cual en 1973 fue definido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como: una afección crónica de etiología diversa, caracterizada por crisis recurrentes, debidas a una descarga excesiva de las neuronas cerebrales (crisis epilépticas), asociadas a manifestaciones clínicas y paraclínicas (36).

La epilepsia es uno de los padecimientos más antiguos de la humanidad, y se le consideraba un mal de origen divino, ya que los enfermos manifestaban cambios de estado de ánimo repentinos (ataques de llanto o risa). Desde los inicios de la humanidad ha tenido un permanente conflicto entre la ciencia y la superstición, ya que en diferentes épocas de la historia de la humanidad se le daban connotaciones mágico-religiosas, atribuciones a posesiones demoníacas, etc. Hipócrates 400 años A.C. ya hacía mención de ella (37), incluso en nuestros días persisten algunas de estas creencias debido a la falta de información, existen ideas y conceptos erróneos con lo que se señala al paciente y a su familia, se le menosprecia, se le trata mal, se les restringen sus posibilidades laborales, se les rechaza socialmente, se considera como un padecimiento físico y psico-social, que se pretende resolver a veces encerrando y alejando al paciente de la sociedad (7).

Conductualmente el término epilepsia abarca una gran gama de crisis (eventos paroxísticos, autolimitantes y estereotipados de corta duración que se manifiestan por alteraciones motoras, sensoriales, autonómicas y psíquicas con posible pérdida de la conciencia), ya que existe un gran número de variantes en los síntomas de este padecimiento; por ejemplo puede haber diferentes tipos de crisis mioclónicas (movimientos musculares espasmódicos y súbitos), ataques atónicos-aquinéticos (caída violenta), catatónicos (con rigidez) (38). Los avances más importantes contra esta patología comenzaron con los estudios de Hughlings Jackson a partir de 1861 describiendo principalmente a la epilepsia focal o parcial la cual empieza en una zona determinada del cerebro. En 1929 Hans Berger introduce la electroencefalografía como una herramienta fundamental para apoyar el diagnóstico de este padecimiento (1).

Las neurociencias son una rama del conocimiento médico que junto con la electrónica y la informática, han creado programas como el de cirugía asistida por computadora (CAC) lo que ha mejorado la práctica de la cirugía estereotáxica (1), permitiendo en la actualidad un gran avance en las líneas de investigación que se enfocan hacia los tratamientos farmacológicos y quirúrgicos, así como al análisis y descripción del funcionamiento del SNC. Lo anterior ha permitido el conocimiento de la epileptogénesis, en donde los múltiples componentes de la actividad eléctrica excesiva que se da como resultado de las descargas neuronales anormales y exageradas, cuya sintomatología en este grupo de células hiperexcitables se caracteriza por la generación de potenciales de acción en determinada área del cerebro, como puede ocurrir en la zona motora, la cual responde con una activación neuromuscular. También se afecta el área relativa a la zona visual, en cuyo caso el paciente podrá percibir pequeñas luces (39). A nivel molecular se ha reportado que estas crisis son consecuencia de una rápida despolarización repetida de las neuronas, asociada a la pérdida de potasio intracelular junto con la acumulación del sodio intraneuronal, así como a la participación de neurotransmisores (NT: sustancia química liberada selectivamente de una terminación nerviosa por acción de un principio activo, que interactúa con un receptor específico en una estructura anatómica adyacente y que produce una determinada respuesta fisiológica) inhibitorios como el ácido gama amino butírico (GABA), o excitatorios como el ácido glutámico, el ácido aspártico y el N-metil-D-aspartato (NMDA) (40,42,152,153), que al ser liberados en el espacio sináptico produce efectos excitatorios o inhibitorios sobre las células postsinápticas, dando como consecuencia, un potencial de acción del tipo de todo o nada que es retransmitido a todas las terminales axónicas y también debido a las alteraciones de la glía que regula el medio extracelular en esta fisiopatología (5,41,42).

Cualquier tipo de crisis epiléptica requiere una evaluación exhaustiva:

Las crisis parciales simples (sin alteración de la conciencia) son el resultado de una lesión cortical limitada, cursan con descarga local contralateral que inicia el área cortical o pueden ser complejas (con alteración de la conciencia) (6,154).

Cuando la actividad eléctrica inicia en todo el cerebro sin un punto determinado, el paciente experimenta una crisis generalizada, y estos ataques primarios incluyen: ausencias, crisis mioclónicas, crisis tónicas, crisis tónico clónicas, crisis atónicas (1,4,154).

Se ha reportado que el término gran mal ó crisis tónico clónicas generalizadas son las crisis que se presentan sin previo aviso, en donde el paciente pierde la conciencia de manera súbita y cae presentando una fase tónica rígida en la cual puede cesar la respiración y se puede llegar a la cianosis, cuando los movimientos se terminan el cuerpo del paciente queda flácido, éste presenta confusión, debilidad, jaqueca y somnolencia (5,6,7).

Este desorden neurológico (epilepsia) se caracteriza por ciertos datos clínicos como: edad de inicio, sexo, antecedentes personales y familiares del paciente, frecuencia e intensidad con la que se presentan las crisis, que pueden poner en peligro la vida del paciente debido a la posible hipertermia, acidosis metabólica, liberación de catecolaminas, edema pulmonar, daño cerebral (43).

Existen diversos factores considerados como mecanismos fisiopatológicos desencadenantes: infecciones y complicaciones durante el embarazo, traumatismo craneoencefálico (mal uso de fórceps durante el parto, accidentes) (44), intoxicaciones alcohólicas, hipoxia cerebral (cordón umbilical enredado durante el parto, parto muy largo), hemorragias, malformaciones vasculares, tumores, causas de origen congénito, alteraciones metabólicas (45).

En México existen reportes de que la cisticercosis es ocasionada por consumir frutas, verduras contaminadas con huevecillos de la *Taenia solium*, carne de cerdo mal cocida e infestada con cisticercos, este parásito se aloja primeramente en el intestino (46,155). Esta neuroinfección es una de las principales causas de epilepsia secundaria en nuestro país. La sintomatología más común de la cisticercosis consiste en dolor de cabeza, confusión mental, trastorno de la sensibilidad y del lenguaje, crisis convulsivas, alteraciones al caminar, parálisis, etc., pero esto no se presenta en todos los pacientes, es considerada en la actualidad como la parasitosis más frecuente del SNC, representando el 10% de las causas de consultas en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) (47).

La etiología de la epilepsia es muy variada, ya que puede manifestarse debido a múltiples patologías cerebrales, siendo dependientes desde el punto de vista molecular de un receptor excitatorio específico denominado NMDA (N-metil D-aspartato), su mayor concentración se encuentra en el hipocampo y en la corteza cerebral (91) es activado por glutamato (GLU) permite la entrada de calcio (Ca^{2+}) al citoplasma (87), durante las crisis epilépticas las células nerviosas se despolarizan de manera anormal y ocurre una liberación exagerada del GLU, el cual a través de los receptores NMDA, genera una entrada masiva de Ca^{2+} al interior de la célula generando procesos de excitotoxicidad (92), lo que produce un daño irreversible que conduce a la muerte neuronal por necrosis o apoptosis, lo que explica en parte el daño neurológico que ocurre después de un *status epilepticus* (85,86,161).

El ácido glutámico y el ácido gama amino butírico (GABA) son los principales neurotransmisores (NT, sustancias químicas que se liberan selectivamente de una terminación nerviosa) excitadores e inhibidores respectivamente que participan en el funcionamiento del SNC desde la etapa prenatal, así como en los mecanismos de la memoria, aprendizaje y plasticidad cerebral (84,86). Los subtipos del receptor a GLU se dividen en ionotrópicos como NMDA, que producen la entrada de Na^{2+} , Ca^{2+} al citoplasma neuronal, además de los receptores 2-amino-4-fosfonobutanoato (AP-4), Kainato (KA) y α -amino-3-hidroxi-5-metiloxazol (AMPA), y los receptores metabotrópicos que son permeables al Ca^{2+} (91,93,158).

Estos receptores excitatorios regulan la producción de importantes efectos tóxicos que originan lisis osmótica, al promover el flujo de agua y cationes, siendo muy importantes en los eventos electrofisiológicos del estatus epiléptico (88,89,90).

Esquema de la Neurotransmisión

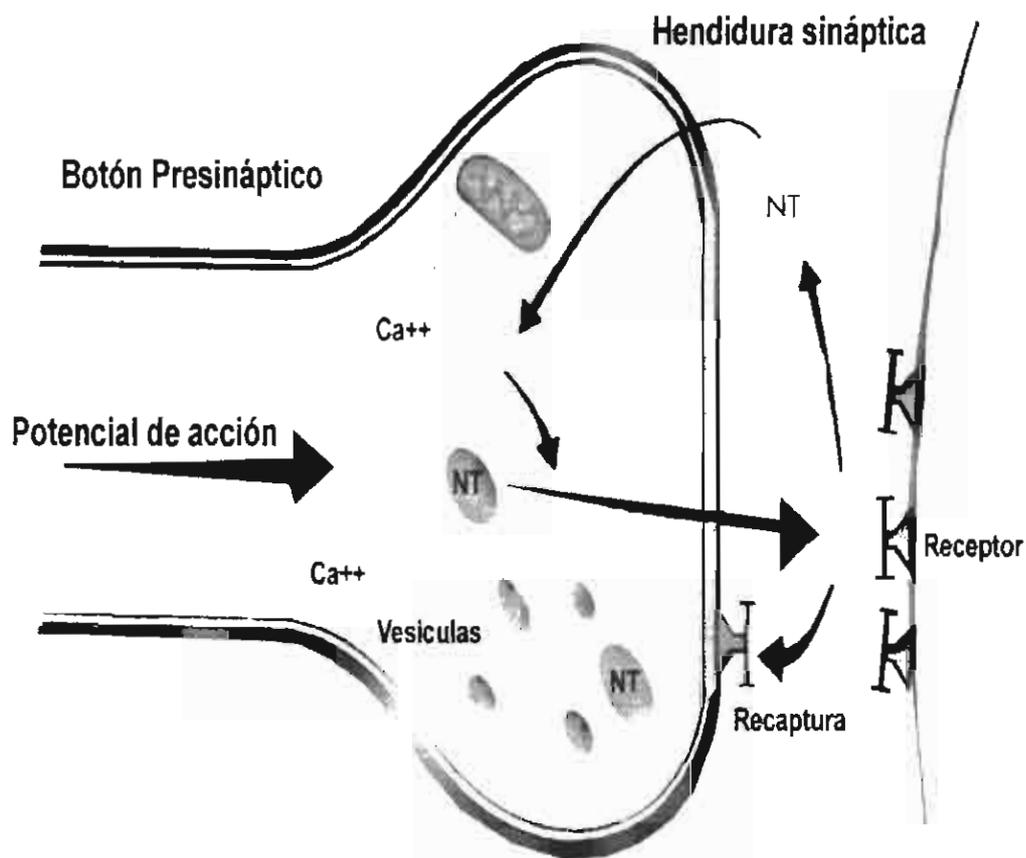


Figura 1. Esquema de la neurotransmisión. Los potenciales de acción abren los canales de calcio. El Ca^{2+} activa la liberación de los NT desde las vesículas de almacenamiento. Las moléculas de los NT llenan la hendidura sináptica, algunas de estas moléculas se unen a los receptores postsinápticos, iniciando una respuesta. El resto de las moléculas son recaptadas hacia el interior del axón y almacenadas nuevamente o bien difunden en los tejidos circundantes.

Se han reportado algunos trastornos neurológicos y psiquiátricos debidos al aumento o a la disminución de la actividad de diversos NT por la acción de un principio activo, que interacciona con un receptor específico en una estructura anatómica adyacente para producir una determinada respuesta fisiológica: los aminoácidos GLU y aspartato (ASP) son NT excitatorios del SNC y están presentes en la corteza cerebral, cerebelo y médula espinal (93).

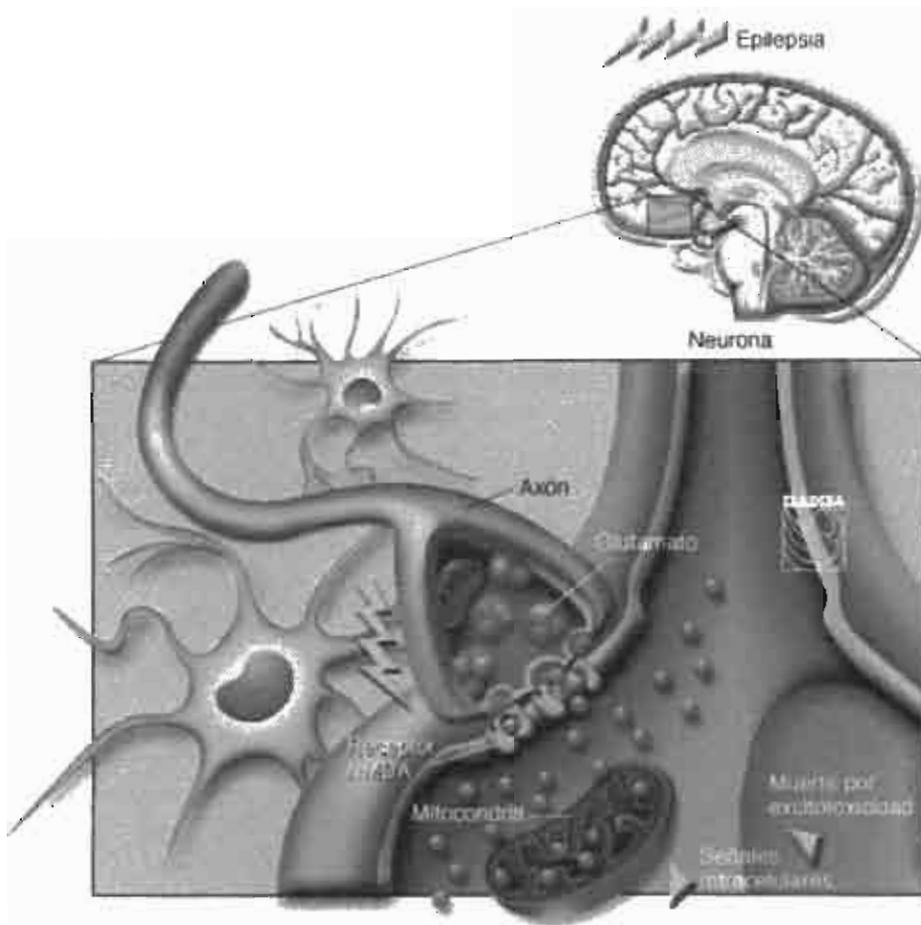


Figura 2. Diagrama que ilustra los mecanismos de excitotoxicidad que producen muerte de neuronas en el sistema nervioso central, en circunstancias diversas como las crisis de epilepsia. Es importante apreciar la entrada masiva de calcio a la mitocondria y la generación de señales intracelulares que culminan con la destrucción de la célula.

Para diagnosticar con mayor certeza la epilepsia es necesario revisar adecuadamente la historia clínica del paciente, realizar una exploración física general,

examen neurológico, la tomografía axial computarizada (TAC) inventada en 1972 por el Dr. Godfrey Hounsfield, la cual es una técnica de elección para poder detectar lesiones estructurales en el SNC en un paciente vivo (5,48,85).

Otra manera de diagnosticar la epilepsia es por medio de los estudios electroencefalográficos (EEG) (85), el cual es un registro temporal de las diferencias del potencial eléctrico (voltaje) entre dos puntos a nivel del cuero cabelludo. El análisis de este estudio es complejo debido a los paroxismos de las puntas (espigas), punta-onda lenta, etc., y se basa en una interpretación visual del registro formado por el trazado complejo de las ondas electromagnéticas cerebrales (49,162).

En 1950, el físico norteamericano Félix Bloch descubrió el principio de la resonancia magnética (RM), el cual se aplicó en la clínica hasta los 80's aumentándose así la definición de las imágenes y permitiendo estudiar con mayor detalle las lesiones cerebrales (85).

Los registros EEG deben ser interpretados visualmente y se requiere observar solamente los componentes del trazado que sean importantes, lamentablemente la confiabilidad en la interpretación del registro EEG depende directamente de la calidad de dicha interpretación y con frecuencia esta es pobre. El problema no sería grave si no fuera seguido de un diagnóstico equivocado de epilepsia y aún peor, medicar con antiepilépticos a quien no los necesita, ya que diversas patologías como la disritmia cerebral presenta un EEG anormal e inespecífico. Existen muchas alteraciones electroencefalográficas inespecíficas, a las que Hughes denominó signos electroencefalográficos blandos (49).

Epilepsia y embarazo

Existen reportes que indican que la epilepsia no está contraindicada en la planificación familiar, bajo vigilancia médica, la mayoría de las pacientes epilépticas que se embarazan, cursan su gestación con pocos o ningún evento epiléptico durante este período; al menos el 90% de los hijos nacidos de mujeres epilépticas son saludables y normales (50).

Existen algunos factores que pueden propiciar un aumento en el número de crisis epilépticas como son: un pobre control de estas antes de quedar embarazada, no seguir la prescripción antiepiléptica, falta de sueño, cambios en el metabolismo de los medicamentos antiepilépticos debidos al embarazo (el nivel de su medicación puede disminuir conforme progresa el embarazo, hasta llegar a su nivel más bajo al momento del parto), estrés emocional, fatiga, bebidas alcohólicas (51,63).

Es muy conveniente mantener un buen registro de la frecuencia de crisis epilépticas y de la medicación prescrita.

El uso de los medicamentos antiepilépticos se recomienda como monoterapia (Fenitoína, Fenobarbital, Carbamazepina) ya que algunos de ellos pueden disminuir la

eficacia hormonal en los anticonceptivos, debido a que aumentan su metabolismo (45,50).

Antiepilépticos

Los antiepilépticos son un grupo de medicamentos química y farmacológicamente muy diverso y están diseñados para controlar pero no para prevenir la aparición de las crisis epilépticas, lo cual refleja la complejidad de la patofisiología de los desórdenes convulsivos (53,54,55).

El primer compuesto químico para controlar la epilepsia fue el bromuro de potasio, que actualmente se utiliza en el tratamiento de los pacientes con porfiria, es relativamente tóxico ya que causa dermatitis y psicosis en algunos pacientes, en 1912 se introdujo uno de los antiepilépticos más conocidos: los barbitúricos (Fenobarbital) que son derivados de la condensación de la urea con el ácido malónico. En 1938 se introdujo la difenilhidantoína que es muy parecida a los barbitúricos pero con un efecto sedante menor. En 1945 se introdujeron las succimidas (eficaces contra la epilepsia del pequeño mal "ausencias") de las cuales de la etosuximida es la más efectiva contra las crisis producidas por pentilentetrazol (PTZ) en animales de laboratorio (54,56,57). Posteriormente se introdujeron oxalidinodionas (Trimetadiona), acetilureas (Fenacemida), las cuales se obtuvieron modificando la estructura original de los barbitúricos y las hidantoínas. En 1963 se descubrió la propiedad anticonvulsiva de la carbamazepina y el ácido valpróico. En 1965 se comenzaron a utilizar las benzodiacepinas (Nitrazepam en epilepsia mioclónica, Diazepam en el status epilepticus).

Más recientemente el Felbamato, la Gabapentina, la Lamotrigina (LTG) que presenta una acción similar al de la carbamazepina y fenitoína, reduce la liberación excesiva de neurotransmisores excitadores sin afectar su liberación normal. Esta acción sobre el glutamato y el aspartato cerebral es dependiente de la dosis y se atribuye a una estabilización de la membrana neuronal presináptica por el bloqueo de los canales de sodio (54,58,59). Sus efectos secundarios son: mareos, diplopía, somnolencia, ataxia, cefalea, astenia, náuseas, vómito, temblor, visión borrosa, depresión (60).

Actualmente también se utiliza la Vigabatrina (gama-vinil GABA, Sabril) que fue el primer antiepiléptico comercializado en España, desarrollado en base a su mecanismo de acción conocido: aumenta el tono gabaérgico, inhibiendo de manera específica, irreversible y selectiva a la GABA-transaminasa (GABA-T), que es la enzima responsable del catabolismo del GABA en su paso a semialdehído succínico aumentando la concentración de GABA en la sinapsis. Sus efectos secundarios: cansancio, somnolencia, mareo, cefalea, diplopía, ataxia, vértigo, visión borrosa, nerviosismo, depresión, agresividad, náuseas, agitación, aumento de peso (61).

Por otra parte en México la presencia del neurólogo en el área de salud se debe a la escisión de la Neuropsiquiatría en Neurología y Psiquiatría y por disposición de la propia Ley General de Salud que pretende un acercamiento hacia el paciente, por parte de los especialistas, lo cual ha traído como consecuencia una excesiva afluencia de enfermos neurológicos no orgánicos, pese a ello no se cuenta aún con datos fehacientes acerca de la frecuencia, ritmo y diagnóstico de los pacientes que acuden a

este servicio asistencial hospitalario (7). Lo cual hace indispensable el uso racional y adecuado de los medicamentos antiepilépticos en monoterapia, controlando los niveles plasmáticos de los mismos, para poder reducir o suprimir las crisis epilépticas hasta en un 80% de los casos, por lo tanto para el 20% restante de los pacientes es de primordial importancia que se continúe con el desarrollo y estudio de nuevas posibilidades terapéuticas, ya sea por modificación de: a) los fármacos clásicos, para mejorar su relación eficacia/toxicidad (Valproatos, Carbamacepina), b) actuar sobre el balance excitación/inhibición cuyo origen se debe al tono gabaérgico (Eterobarbital, Progabide, Gabaculina, Vigabatrina), c) por inhibición del tono glutamatérgico (Felbamato, Lamotrigina), d) inhibidores de la corriente de sodio (Ralitolina), e) diversos mecanismos de acción aún no bien esclarecidos (Gabapentina, Topiramato, Topamax) (62).

Clasificación de fármacos antiepilépticos

BARBITÚRICOS Y COMPUESTOS RELACIONADOS: Son derivados del ácido barbitúrico que tienen dos sustituyentes en posición 5: Fenobarbital (Alepsal, Fennabot), (Solfoton), Gaedenal, Luminal, Luminaletas, Mefobarbital (Mebaral), Metabarbital Gemonil), Primidona (Mysoline, Myidone).

HIDANTOÍNAS: Son el resultado de una investigación planeada en busca de nuevas sustancias capaces de suprimir las crisis convulsivas causadas por electrochoque en los animales. Cumatil, Fenitoína (Epamin, Fenotron, Fenidantoin, Dantoinal, Dilantín, Difenilán), Fenigramon, Mefenotoína (Mesantoína), Etotoína (Peganone). Se emplean en el manejo de la epilepsia tónico-clónica y parcial.

SUCCINIMIDAS: Surgieron de la búsqueda sistemática de agentes eficaces, pero menos tóxicos que las oxazolodinadionas, para el tratamiento del pequeño mal, crisis de ausencia típicas y atípicas. Etosuximida (Zarontín), Metosuximida (Celontín), Fensuximida (Milontín).

OXAZOLIDINADIONAS: Poseen los sustituyentes alquilo en el carbono 5 los cuales son importantes para su selectividad como antagonistas del Pentilentetrazol en animales y como agentes clínicamente útiles para tratar el pequeño mal: Trimetadiona (Tridione), Parametadiona (Paradione).

BENZODIACEPINAS: Clonazepam (Klonopín, Rivotril), Diazepam (Valium), Clorazepato, Rivotril (Tranxene), Lorazepam.

CARBOXAMIDICOS: Carbamazepina (CBZ) estructuralmente es parecida a los antidepresivos tricíclicos, es absorbida lentamente en el tracto gastrointestinal y se oxida parcialmente dando como metabolito a un epóxido activo. Actinerval, Atoxecar, Aurene, Carbagramon, Carbolando, Carbamat Deltateril, Tegretol, Trileptal .

ANTICONVULSIVOS MISCELANEOS: Acido Valpróico (Epival, Depakene, Leptilan), Divalproex sódico (Depakote), Fenacemida (Phennuerone), Azetasolamida (Diamox), ACTH, Corticoesteroides, Lamictal, Gabapentina (Neurontin).

Algunos de ellos se utilizan para un tipo específico de epilepsia, por ejemplo contra el gran mal se usan: Beclamida, Carbamazepina, Fenitoína, Fenobarbital, Mefenitoína, Primidona, Vigabatrina; para el pequeño mal se usan Clonazepam (Kenoket, Rivotril), Clorazepato, Etosuximida, Acido Valpróico (Valprosid), Valpromida (8,54,56,64,68,74).

Interacciones de algunas sustancias con los anticonvulsivos.

Ácido Fólico

- *Fenitoína*: El ácido fólico contrarresta el efecto de la fenitoína. Si se administra en forma prolongada la fenitoína, pueden disminuir los niveles séricos del ácido fólico.
- *Fenobarbital*: El ácido fólico contrarresta el efecto del fenobarbital.

Acido Nalidíxico

- *Nitrofurantoína*: El efecto antibacteriano del ácido nalidíxico podría ser antagonizado por la nitrofurantoína.

Acido Valpróico

- *Ácido Acetilsalicílico*: El uso simultáneo de estas sustancias puede provocar un aumento de los niveles plasmáticos de ácido valpróico, con peligro de intoxicación.
- *Alcohol*: El ácido valpróico puede potenciar la actividad depresora del alcohol sobre el sistema nervioso central.
- *Antidepresivos Tricíclicos*: El ácido valpróico puede potenciar la acción de los antidepresivos tricíclicos.
- *Carbamazepina*: La administración conjunta de ácido valpróico y carbamazepina puede producir una reducción de los niveles séricos del ácido valpróico.
- *Clonazepam*: Al usarse junto con el ácido valpróico puede producir estado de ausencia.
- *Fenitoína*: El valproato inhibe el metabolismo de la fenitoína siendo posible un aumento de la concentración de fármaco libre.
- *Fenobarbital*: Si se administra ácido valpróico a pacientes medicados con fenobarbital puede producir un aumento de los niveles plasmáticos del fenobarbital con riesgo de intoxicación.
- *Inhibidores de la MAO*: El ácido valpróico puede potenciar la acción de los inhibidores de la monoaminoxidasa.
- *Oxcarbazepina*: La oxcarbazepina puede aumentar ligeramente la eliminación del ácido valpróico.
- *Primidona*: La administración de ácido valpróico a pacientes tratados con primidona puede ocasionar un incremento de los niveles plasmáticos de primidona con peligro de intoxicación.

Alcohol

- *Fenitoína*: disminuye su efecto, ya que aumenta su metabolismo por inducción enzimática microsomal.
- *Anticoagulantes orales*: aumentan la toxicidad de la fenitoína debido

a su aumento metabólico enzimático microsomal

- *Antidepresivos Tricíclicos*: aumentan la toxicidad de la fenitoína, aunque este mecanismo de acción no ha sido determinado aún.
- *Cloramfenicol, Dicumarol, Disulfiram, Fenotiazinas, Isoniazida*: aumentan la toxicidad de la fenitoína por que disminuye su metabolismo por inhibición enzimática microsomal.
- *Fenitoína*: La ingestión aguda de etanol disminuye su depuración, dado que ambos compiten por el mismo sistema de oxidasas microsomales hepáticas. En el alcoholismo crónico hay una inducción enzimática por el alcohol y un período de abstinencia lleva a una tasa de depuración aumentado de Fenitoína.
- *Furosemda*: La Fenitoína produce una disminución en el efecto diurético de la Furosemda, ya que disminuye su absorción.
- *Fenitoína*: La Fenitoína puede reducir la unión de los antidepresivos a la albúmina plasmática, potenciando su efecto.

Barbitúricos

- *Acido Valpróico*: Al administrar el ácido valpróico a pacientes medicados con fenobarbital puede aumentar los niveles séricos del barbitúrico.
- *Fenitoína*: El uso simultáneo de fenobarbital y fenitoína puede producir cambios impredecibles en los niveles plasmáticos de la fenitoína.

Benzodiazepinas

- *Acido Valpróico*: Si se usan simultáneamente estas drogas puede aumentar el efecto depresor de las benzodiazepinas sobre el SNC.
- *Barbitúricos*: La acción de las benzodiazepinas puede ser potenciada por los barbitúricos.
- *Carbamazepina*: Si se administran simultáneamente clonazepam y carbamazepina se puede perder el control de las crisis epilépticas.
- *Fenotiazinas*: La acción de las benzodiazepinas puede ser potenciada por las fenotiazinas.
- *Inhibidores de la MAO*: La acción de las benzodiazepinas puede ser potenciada por los inhibidores de la MAO.
- *Isoniazida*: El uso simultáneo de diazepam e isoniazida puede potenciar la acción de la benzodiazepina.
- *Rifampicina*: El uso simultáneo de diazepam y rifampicina puede reducir el efecto de la benzodiazepina.
- *Tabaquismo*: El tabaquismo excesivo puede disminuir la eficacia de las benzodiazepinas administradas en sus dosis habituales.

Betametasona

- *Fenitoína*: El uso conjunto de fenitoína y betametasona puede aumentar el metabolismo del corticoide disminuyendo su acción terapéutica (54,67,69,70,71).

Estudios preclínicos

Debido a las implicaciones éticas y científicas que exigen realizar el diseño de un protocolo, su conducción y la publicación formal del estudio clínico, no es siempre posible trabajar experimentalmente con seres humanos, por lo que se recurre al trabajo experimental con animales de laboratorio (estudios preclínicos), ya que son de fácil manejo, son menos costosos, permiten obtener de manera rápida una respuesta fisiológica, toxicológica permitiendo llevar a cabo la evaluación de la seguridad de su uso en diversos modelos animales (12,75).

A través de estudios neuroquímicos, neuroanatómicos ultraestructurales e inmunocitoquímicos ha sido posible demostrar que muchas de las sustancias empleadas experimentalmente para modificar el funcionamiento del SNC se agrupan como analépticos sintéticos (estricnina, picrotoxina, bicuculina pentilentetrazol, etc.) (76,159). Se caracterizan en general por incrementar el estado de alerta, por incrementar la frecuencia y profundidad respiratoria ya que actúan directamente sobre el sistema reticular cerebral y las vías corticoespinales (77), los cuales tienen una microorganización interneuronal que contienen interneuronas GABAérgicas, calretinina (proteína fijadora de calcio se localiza en las células piramidales) (78).

Los modelos experimentales de epilepsia se clasifican en:

Inducidos por agentes físicos, que afectan receptores sensoriales o áreas encefálicas por medio de estímulos eléctricos: electrochoque, *kindling* (estímulos eléctricos localizados o aplicación de diferentes dosis de sustancias en un área específica del cerebro), acústicos o fotónicos, que producen cambios degenerativos y regenerativos (12,79).

Inducidos por agentes químicos: aplicación tópica (penicilina, crema de alúmina, cobalto), por administración sistémica vía intraperitoneal (i.p) de ácido kaínico, intravenosa (i.v), subcutánea (s.c), picrotoxina y el pentilentetrazol, el cual es un agente convulsionante que actúa en el SNC de los mamíferos, estimulando la corteza cerebral, ya que disminuye el período de tiempo necesario para la recuperación de la vía monosináptica medular e impide la aparición de períodos refractarios inhibitorios dando lugar así a la aparición de convulsiones (7,80,81,82).

Se han planteado diversos modelos animales para el estudio de las crisis epilépticas:

Parcial simple, aguda

Agentes convulsivantes tópicos: Penicilina, Bicuculina, Picrotoxina, etc.
 Estimulación eléctrica aguda
 Síndrome de abstinencia al GABA
 Rebanadas de corteza cerebral

Parcial simple, crónica

Metales aplicados directamente en la corteza: Cobalto, Tungsteno, Zinc
 Daño por congelamiento
 Inyecciones de gangliósidos
 Epileptogénesis focal sistémica

Tónico-clónica generalizada

Genética: mandriles fotosensibles, crisis audiogénicas en ratones, ratas, y perros epilépticos
 Electrochoque
 Agentes convulsivantes químicos: Penicilina, Bicuculina, Pentilentetrazol
 Trastornos metabólicos: hipoxia, hipoglicemia, uremia, temperaturas elevadas, abstinencia a drogas

Parcial compleja

Acido Kaínico
 Inyección en área tempestas
 Kindling

Ausencias generalizadas

Estimulación talámica
 focos corticales bilaterales

Estatus epiléptico

Litio-pilocarpina
 Cobalto-Homocisteina (12)

Terapias alternativas

En los últimos años se ha experimentado un aumento notable en la difusión y la práctica de la medicina alternativa (complementaria) (157), debido a la insatisfacción de parte de los pacientes con los tratamientos convencionales, a una necesidad de autocontrol, a una congruencia filosófica. El término naturopatía incluye una gran variedad de prácticas alternativas para la curación de los pacientes, entre las que se encuentran el cuidado de la dieta, cambios en el estilo de vida, la homeopatía, la acupuntura, la aromaterapia, la hidroterapia, hierbas, psicoterapia, ejercicios terapéuticos, el yoga, la manipulación de la columna, terapias físicas que usan corrientes eléctricas, el ultrasonido, la fototerapia, etc. También la farmacología es usada en la medicina naturopática (113,114).

Los principios básicos en que se basan estas alternativas medicinales son: el poder curativo de la naturaleza, tratar la causa en vez del efecto y ante todo, no hacer daño, tratar a la persona como un ser completo.

Dentro de los factores que se toman en cuenta para determinar el esquema de un tratamiento, se encuentra la dieta, el estilo de vida y la historia clínica del paciente.

El cuidado de la dieta implica ciertas dietas terapéuticas necesarias en el caso de pacientes con cierto tipo de enfermedades (insuficiencia cardíaca, diabetes, obesidad, etc) que requieren un cambio en los hábitos alimenticios, sin que se desnivelen sus requerimientos nutricionales (113).

Los cambios en el estilo de vida consisten en crear conciencia en el paciente que debe de convivir más con la naturaleza, conocer el funcionamiento adecuado de su propio organismo, evitar situaciones perjudiciales como son las tensiones nerviosas, sustancias dañinas como el tabaco, el alcohol, etc., cambiar sus hábitos alimenticios, tomar periódicamente un descanso (113,114,115).

El término homeopatía proviene del griego *omoios* igual y *pathos* sentimiento, fue acuñado por el médico y químico alemán Samuel Hahnemann, para referirse a la medicina convencional basada en el uso de medicamentos que contraatacan los síntomas de cierta patología generando una respuesta curativa en el paciente (113).

La acupuntura es un antiguo sistema Chino de curación, se remonta a más de 5,000 años. Según la definición de acupuntura, esta terapia se basa en el equilibrio de los cinco elementos de la naturaleza: fuego, tierra, metal, agua y madera. Los practicantes de la acupuntura dicen que cuando estos elementos no se encuentran balanceados la energía no está distribuida de manera apropiada o queda atrapada dando como resultado las enfermedades. Por lo tanto tratan de lograr el balance de la energía o chi (gi) de los 5 elementos aplicando agujas en los meridianos que son la estructura energética del cuerpo. La acupuntura propone ayudar a liberar y hacer fluir correctamente la energía, iniciándose el proceso de la curación (113,115).

La palabra aromaterapia fue acuñada por el médico francés Gattefosse, quien experimentó con diversas plantas y aromas hasta descubrir las reacciones y efectos que causaban a nivel psicológico o espiritual a principios del siglo pasado. La aromaterapia es el arte y la ciencia (en cada extracto de cada planta, en cada aceite natural o sustancia de la naturaleza, palpita la esencia de la vida con sus propiedades de curación, leyes y efectos físicos y psicológicos) de usar mezclas de aceites esenciales, extractos de plantas, y las mismas plantas, que produzcan energía, para mejorar la calidad de la vida, brindando bienestar en el más amplio sentido, a nivel físico, psíquico y espiritual, sin embargo este médico francés llegaba con varios milenios de retraso a una sabiduría popular de inmemoriales raíces en varias culturas (115).

La hidroterapia incluye todas aquellas aplicaciones curativas que se le den al agua, como pueden ser baños y duchas de agua dulce, baños de temperatura alterna, baños de asiento y cuya finalidad es que el agua no se disperse y actúe en forma más directa provocando cambios en la circulación sanguínea, tratar espasmos vasculares, también se pueden inducir cambios metabólicos (113).

Otra terapia alternativa es el Ayurveda, que es un sistema *holístico* de medicina que significa "la ciencia de la vida". Se originó en la India y ha sido parte de la vida diaria en ese país por más de 5.000 años. La palabra Ayurveda es un término sánscrito compuesto por "Ayus" vida y "Veda" conocimiento o ciencia; por lo tanto también se le conoce como el "conocimiento de la duración de la vida". En la medicina Ayurvédica se ha esparcido por todos los rincones del mundo, lo importante es el paciente, de ahí que se importante establecer un perfil general de la persona, lo que es el punto fundamental y básico para identificar el tipo metabólico del paciente. No lo es la enfermedad. Ya que la teoría ayurvédica enuncia que todas las enfermedades comienzan con un desequilibrio o estrés en la conciencia individual. Una vez ha sido identificado el tipo de desequilibrio corporal o metabólico, los médicos ayurvédicos diseñan un plan de tratamientos para retornarle su equilibrio armónico con su entorno (113).

Se reportó que en 1990, 245 millones de personas recurrieron a la medicina alternativa en los Estados Unidos (114), la Oficina de Medicina Alternativa del Instituto Nacional de la Salud de los Estados Unidos, explica que "la medicina ayurvédica plantea un acercamiento integral hacia la prevención y tratamiento de enfermedades a través de un cambio en el estilo de vida y terapias naturales".

Actualmente existe un total de 300,000 médicos ayurvédicos que la practican en la India. Estos médicos reciben entrenamiento institucionalizado reconocido estatalmente, paralelo al de sus contrapartes médicas en los sistemas apoyados por el estado de la India para la biomedicina convencional occidental y la medicina homeopática. Frecuentemente los médicos ayurvédicos trabajan en conjunto con médicos entrenados en occidente, médicos convencionales u homeópatas, englobando las diferentes terapias, los estudios científicos metódicos son determinantes para la evaluación y explicación de los mecanismos de acción de la medicina naturista y complementaria (115,116,117).

En las bibliografías médica india y psicológica occidental se aprecia un aumento en las investigaciones respecto a los efectos fisiológicos de técnicas meditativas y posturas yogas. Estudios publicados documentan reducciones en factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares (hipertensión), colesterol y reacción al estrés en individuos que practican métodos ayurvédicos, informa también la Oficina de Medicina Alternativa del Instituto Nacional de la Salud de los Estados Unidos.

Los practicantes ayurvédicos enseñan a los pacientes a entender las constituciones de sus cuerpos y mostrarles cómo usar la dieta, el masaje, las hierbas y ajustes en el estilo de vida para armonizar el cuerpo, la mente y espíritu (113).

Otra terapia alternativa es la meditación Yoga, que procede del sánscrito yuj y significa unión e implica tener conciencia de nuestra real identidad entre la materia y el espíritu, el uso apropiado del poder del pensamiento en forma positiva, es decir la experiencia de las cualidades y virtudes del ser (113,115).

Relevancia de nuevas fito-medicinas en el campo terapéutico

Debido a la importancia en el desarrollo de la terapia medicamentosa con productos naturales como los vegetales, es necesario que su identificación y recolección se haga por parte de especialistas, para minimizar el riesgo de confusiones y/o errores al usar este tipo de productos de gran biodiversidad. Solamente un 2% de los productos naturistas tanto de origen vegetal como animal han sido evaluados de manera sistemática para poder determinar su valor medicinal (94).

Partes utilizadas de las plantas.

Una vez llevada a cabo la identificación y recolección de la especie vegetal deseada, los especímenes se lavan y posteriormente se desecan a una temperatura de 40 °C, se pueden utilizar las raíces, tallos, hojas, flores, semillas (10).

Los remedios preparados a partir de plantas medicinales (infusiones, extractos, percolaciones) representan una importante proporción del total de recursos terapéuticos en el mercado global de los medicamentos. En 1992 la Organización Mundial de la Salud (OMS) (95) publicó los métodos de control de calidad para materiales de plantas medicinales con fines curativos y de esta manera poder garantizar el uso de estos productos, de acuerdo a estas políticas de la OMS, en la tercera edición de la Farmacopea Internacional se anexaron especificaciones de calidad de algunas plantas y de los materiales obtenidos de las mismas (96).

En nuestra Legislación Sanitaria se están efectuando algunas modificaciones respecto a la comercialización de los productos herbolarios, utilizados como remedios naturales en un sentido tradicional “remedios caseros” con fines medicinales (fitofármacos), constituyéndose como un gran cambio y reconocimiento de la Fitoterapia (Herbolaria medicinal), debido a la urgente necesidad de aplicar criterios para la determinación de la calidad de este tipo de productos para el consumo humano, como una nueva alternativa para el tratamiento de diversas patologías, se han creado y

se aplican políticas sanitarias incluidas en la Ley Federal de Sanidad Vegetal, así como la reglamentación contenida en la Ley General de Salud en materia de prestación de servicios de atención médica (artículos 223, 224 fracción III, 310), que establecen normas y regula su comercialización, permitiendo a la vez el establecimiento de especificaciones y la estandarización respecto de la formulación de dichos preparados herbolarios y/ naturales, de modo que exista un registro fitosanitario que garantice la calidad, seguridad y eficacia de estos productos (96).

Para poder aplicar en una terapia los productos fitofarmacológicos, se debe considerar que parte del vegetal será empleada, y el método de extracción correspondiente, ya que se puede obtener una gran diversidad de diferentes extractos, en relación a sus constituyentes. Existen diversos factores que determinan la calidad de un extracto vegetal, como son: la especie de la planta (puede variar el contenido de los ingredientes fitoquímicos), la parte a emplear (raíces, tallo, hojas), calidad del material vegetal, ya que este se adapta a su entorno y puede contener impurezas. También hay que tomar en cuenta la edad de la planta, tipo de terreno en el que se desarrolla (ya que generalmente, mediante el tratamiento de plantas cultivadas, se obtienen variaciones del material vegetal inicial), procedimiento estandarizado de preparación del extracto en instalaciones, equipo y material adecuado que garanticen una calidad controlable y la eficacia del producto a través de estudios clínicos (97).

Existen algunos reportes etnobotánicos de productos que presentan propiedades anticonvulsivas como es el caso de la *Casimora edulis*, la cual se estudio en el modelo de máximo electrochoque y PTZ en ratas (118), hay reportes del empleo combinado de la *Valeriana* con *Espino blanco*, *Pasiflora*, *Marrubio negro* para el tratamiento de distonías neuro-vegetativas e insomnios (11,18).

En general las especies del género *Valeriana* son conocidas a nivel mundial por sus efectos hipnóticos, antiespasmódicos, antiepilépticos, se les han atribuidos propiedades analgésicas y cicatrizantes, se han descrito ampliamente para el tratamiento de histeria, insomnio, cefaleas, neurosis, palpitaciones cardiacas, espasmos musculares, dismenorrea, menopausia e hipocondria (14). Existen también reportes acerca de que la *Valeriana officinalis* tiene efectos espasmódicos, ansiolítico, tranquilizante y sedantes (119), casi no existen reportes acerca de los usos de la *Valeriana edulis*, pero por el alto contenidos de principios bioactivos como los valepotriatos podría tener actividad anticonvulsiva (107).

Descripción etnobotánica del género *Valeriana*

El género *Valeriana ssp* se encuentra distribuido ampliamente en Europa Central (Alemania, Francia, etc), Inglaterra, Asia, América; la mayoría de sus especies se encuentran en las zonas montañosas templadas del hemisferio norte, con una altitud superior a los 2000 metros sobre el nivel del mar, con abundante luz solar (18), se encuentra distribuido también en sitios como los Andes de América del sur y México, en el cual se conocen mas de 42 especies (14).

Familia Valerianacea.

Esta familia agrupa a 150 especies de hierbas anuales de aproximadamente 1 a 2 metros de altura, habitan a una altura de 2480 a 3500 metros sobre el nivel del mar, crece de manera espontánea en las praderas húmedas, a orillas de los riachuelos y arroyos de las montañas, se desarrollan mejor si el terreno es calizo, consta de rizomas pivotantes, estolones, con tallos fistulosos cilíndricos y/o cuadrangulares, hojas opuestas cruzadas, basales, enteras, lobadas, con margen cerrado, dentadas y de textura membranacea o firme, de color verde vivo y a veces son aromáticas, con inflorescencias pequeñas en forma de dicasios, tirsos o cimas compuestas, con flores hermafroditas que se desarrollan entre mayo y junio, presentando el cáliz enroscado durante la floración; en la fructificación forma un vilano plumoso que consta de 6 a 20 cerdas unidas en la base por una membrana transparente, corona infundibular subcampanulada y con tubo giboso o recto (14,18,101).

Diversas especies del género *Valeriana*.

Existen diversas especies del género *Valeriana* como: *sorbifolia*, *tolucana*, *wallichii*, *ceratophylla* HBK, *Clematis* HBK, *scorptoides* DC, *paniculata*, *dondollana*, *edulis* ssp *procera*, etc.

La *Valeriana officinalis*.

Esta crece en toda Europa, por lo general en cualquier tipo de clima y se puede encontrar en forma silvestre en las márgenes de los ríos, en los bosques húmedos, también es una planta cultivada. Existe una gran variedad de plantas de esta especie distinguibles por el color de sus flores, pero todas poseedoras de los mismos efectos; sus extractos han sido utilizados por los hipocráticos desde los siglos IV y V A.C. como remedio para las afecciones femeninas (cambios hormonales normales, cólicos, mareos, etc), así como para controlar la excitación nerviosa, contra el insomnio y las palpitations causadas por la ansiedad, se le confieren también propiedades tranquilizantes, sedativas (usado en medicina tradicional por centurias) e hipnóticas (98,99,103), ya que contiene aceites esenciales, ácido valerénico y sus derivados, así como valepotriatos y cuya concentración de bioactivos cambia de manera estacional (160).

Ejemplar de la *Valeriana edulis ssp procera* Herbario UAM-X



Ubicación taxonómica de la *Valeriana edulis ssp. procera*

división:	Fanerogamae
subdivisión:	Angiospermae
subclase:	Dicotiledónea
orden:	Rubiaceas
familia:	Valerianacea
género:	Valeriana
especie:	edulis
subespecie:	procera

En particular la *Valeriana edulis ssp procera* (raíz de gato, raíz de oso, mazatanes, ucares) se distribuye en Chihuahua, Durango, Jalisco, Michoacán, Sierra de Pachuca, Puebla, Tamaulipas; dentro del Valle de México se encuentra en Cuajimalpa, Milpa Alta, y de Texcoco a Amecameca se localizan en los bosques de encino, pino, cipreses y oyamel, es una hierba robusta, perene que mide de 70 a 100 cm de altura tiene una superficie oblonga con hojas largamente espatuladas que miden de 10 a 15 cm de largo, tiene flores blanquecinas, hermafrodita, paniculadas de 2 a 3 mm de longitud, florece de Mayo a Junio, fructificando de Julio hasta Septiembre (14,19,100,136).

Habitat de la *Valeriana edulis*



Fitoconstituyentes de la *Valeriana edulis*

Sus constituyentes fitoquímicos son: almidón trazas de alcaloides, aceites esenciales (ésteres de borneol y del isoeugenol), ésteres terpénicos (isovalerianato, acetato y formiato de bornilo, isovalerianato de eugenilo), ésteres epoxidoides (valepotriatos, ácido isovalérico, ácido hidroxivalérico, valerosidato), valtratos, dihidrovaltrato, isovaltrato), acevaltrato, isovaleroxi-hidroxi-didrovaltrato, ácido valpróico, como compuesto mayoritario (11,97,102,103)

Actividad farmacológica

Se ha reportado que la *Valeriana* debido a su composición bioactiva puede ser útil desde una perspectiva farmacológica por su acción en el SNC como sedante, antiepiléptico efectivo en las crisis generalizadas, en las crisis tónico-clónicas, crisis mioclónicas, crisis de ausencia (104,105) para su identificación y caracterización correspondientes.

La parte usada de dicha planta es el rizoma despide un característico olor desagradable muy gustado por los gatos (14). La esencia de *Valeriana* contiene 20% de un terpeno que puede descomponerse en levopincno y levicanfeno, alcanfor de borneol y ésteres fórmico acético y valerianico, ácido valerianico que es un alcaloide sólido, incristalizable, incoloro, casi insípido, soluble en agua y alcohol (98).

Rizoma de la *Valeriana edulis* ssp procera (Milpa Alta)



Su producción está condicionada por la variedad de la planta silvestre, si se cultiva depende de la naturaleza del suelo, abonos y clima; las raíces son desenterradas en septiembre, se lavan perfectamente con un cepillo de plástico de cerda semisuave para quitarle los pequeños pelos radicales, el resto de la raíz se cuelga para secarla; las que contienen mayor proporción de principios activos son aquellas que por lo menos tienen ya dos años de edad, desarrollando el olor típico de la especie cuando ya está seca debido a la formación del ácido bornil-isovaleriano (18).

Existen desde 1997 datos acerca de la comercialización en México de este tipo de productos; por ejemplo el extracto alcohólico (elixires, tinturas) de la raíz de *Valeriana officinalis* en presentación de 200 ml costaba \$39.50 y la presentación de 500 ml tenía un precio de \$ 83.00; la combinación de varias plantas y/o raíces para tratar la ansiedad y que contiene 750 mg de *Valeriana edulis*, 1000 mg de *Passiflora incarnata*, 750 mg de *Scutellaria lateriflora* en una presentación de 200 ml tenía un precio de \$ 39.00 (99).

Dosis recomendadas

Cuando se usa para casos de nerviosismo, ansiedad, insomnio, dolores de cabeza, cólicos intestinales, problemas menstruales, como sedante, antiespasmódico en:

- a) infusión: una cucharadita por taza, infundir 15 minutos, y tomar tres tazas al día.
- b) producto macerado: colocar 100 g de producto en 1 litro de agua tibia, dejar macerar por 12 horas y se toman 2 ó 3 tazas al día.
- c) tintura: 20–60 gotas, de 2 a 4 veces al día (18).
- d) suspensión obtenida de planta fresca integra 2.5 ml tres veces al día.

e) extracto seco nebulizado 0.3 a 2 g/día (1g de extracto equivale a 4 g de planta seca).

f) polvo de raíz 1-4 g/día (104,106,107).

Algunas de las formas galénicas de la valeriana son: tabletas de 500 mg de *Valeriana edulis* tenía un precio de \$ 23.00, existen incluso algunas marcas comerciales como el Navizil comprimidos en cuya formulación se incluyen 50 mg de valepotriatos, cuya posología es tres veces al día y tenía un precio de \$ 11.75 es elaborada por los laboratorios Gador (107), Plantival grageas cuya formulación contiene 160 mg de *Valeriana officinalis*, 80 mg de *Melissa officinalis* elaborada por laboratorios Farma Schwabe (99).

La Food and Drug Administration (FDA) en los Estados Unidos no ha emitido una evaluación acerca de estos productos de los cuales aparece información en Sequential Healing Health Services, por lo que es recomendable que se tenga un buen diagnóstico para poder tratar alguno de los padecimientos que con este tipo de productos se afirma se pueden obtener buenos resultados de salud (102,120,121).

Efectos adversos de *Valeriana edulis*

Se ha reportado que el consumo excesivo de *Valeriana* puede producir náuseas, pérdida transitoria del cabello, sedación, temblor, ganancia de peso, psicosis (104), y en algunos pacientes puede elevar los niveles de transaminasas séricas, produciendo diferentes manifestaciones clínicas como hepatopatía fatal a los 6 meses de iniciada la terapia (pérdida del control de las crisis), malestar generalizado, mareo, hiperactividad, debilidad, letargia, anorexia, vómito; además puede causar defectos en el tubo neural durante el embarazo, puede inhibir también el metabolismo del fenobarbital y altera la concentración plasmática de fenitoína (PHT), por un mecanismo de competencia en la fijación a proteínas (68,74).

Usos

Es utilizado en productos aromáticos intermedios de perfumería, como lubricante, plastificante, estabilizante vinílico y en la industria farmacéutica (Divalproex sódico: 125 a 250 mg de principio activo) (54,64).

Efectos adversos

Su uso está limitado por su potencial irritante y tóxico debido a la formación de radicales libres, transformándolo en un producto hepatotóxico, ataxia, sedación, náuseas, vómito, molestias gastrointestinales (agruras), mareos, temblor, alopecia transitoria (caída de cabello), aumento de peso, pancreatitis, hepatotoxicidad, anemia aplásica, leucopenia (64,66,74,109).

Alcohol etílico

Etanol su fórmula es: C_2H_5OH , peso molecular 46g/mol.

Cuando está en forma pura tiene un punto de ebullición de 78°C y una presión de vapor de 44 mm Hg a 20°C, se utiliza como solvente (se utilizó como vehículo para el extracto hidroetanólico), antiséptico, reactivo químico, como bebida (etanol potable). Es una sustancia muy hidrofílica, que se absorbe rápidamente en el sistema digestivo y a través de los alvéolos, distribuyéndose al resto del organismo por la sangre, la legislación establece los requisitos sanitarios para el proceso y uso del alcohol etílico a través de la Norma Oficial Mexicana (NOM-076-SSA1-1993) (110).

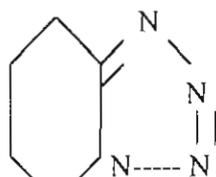
Los reportes farmacocinéticos indican que su volumen de distribución (Vd) es de 0.6 lt/Kg, se metaboliza por medio de reacciones de oxidación que dan lugar al acetaldehído, dióxido de carbono y agua a una velocidad de 100-110mg/Kg/hr.

El etanol deprime el SNC lo cual es la máxima manifestación de intoxicación, provoca cambios conductuales (112), puede causar cambios degenerativos en el hígado (cirrosis hepática), sistema digestivo (gastritis atrófica), riñones y cerebro (111).

En los animales experimentales se debe establecer cuál es el efecto producido por la administración de alcohol (sedación, disminución de la actividad locomotriz, aumento en el ritmo respiratorio, etc.) sobre todo cuando se emplea como vehículo para administrar el principio activo (112).

Pentilentetrazol (metrazol)

Fórmula estructural:



Peso molecular: 138g/mol

El pentilentetrazol (PTZ), químicamente es el pentametileno tetrazol, es un derivado del tetrazol.

Es un compuesto que al ser administrado parenteralmente a las diferentes especies de animales vertebrados, induce convulsiones, por un mecanismo estimulante del eje cerebro medular induce sacudidas mioclónicas, y subsecuentemente crisis tónico-clónicas generalizadas, con la administración intravenosa (i.v.) de una solución al 1% ó 50mg/Kg produce crisis clónicas y a 90 mg/Kg produce crisis tónico-clónicas; por vía subcutánea (s.c.) se logran similares efectos con 85 mg/Kg. A nivel molecular se ha demostrado que modifica (cierra) los canales celulares, ya que actúa en el sitio de unión a los receptores GABA_A y a las Benzodiacepinas. Su tiempo de t_{1/2} es de 3.8 hrs.

Pequeñas concentraciones de PTZ producen despolarizaciones paroxísticas y alteran la conductancia del ión cloruro de los invertebrado; experimentalmente se ha demostrado que inhibe la conductancia del ión cloruro en cultivo de neuronas de médula espinal de ratón, produce descargas en la región CA₃ del hipocampo (9,12,122,123,124,125).

Mecanismo de acción

Su mecanismo de acción aparentemente es la disminución en el tiempo de recuperación de las neuronas dando lugar a descargas eléctricas rápidas y repetitivas produciendo un aumento del consumo de O₂ cerebral y flujo sanguíneo, que puede modificar el ritmo respiratorio y afectar al cerebro por la falta de oxígeno (125).

Se absorbe y distribuye rápidamente en todos los tejidos corporales y se metaboliza a nivel hepático (109).

Existen estudios que indican el establecimiento del *kindling* (fenómeno de epileptogénesis usado como modelo experimental de epilepsia del lóbulo temporal) involucra en ratones al N-metil D-aspartato (NMDA) y con la aplicación de PTZ permite el establecimiento del *kindling*, al utilizar aplicaciones repetidas de dosis subconvulsivas (37.5 a 48 mg/Kg) de PTZ, lo que también produce marcados cambios en la excitabilidad hipocampal (126,127).

Otros estudios hacen responsables a las neuronas gabaérgicas de producir cambios mutagénicos en hamsters a los que se les administra una dosis subconvulsiva (25mg/Kg i.p.) o aplicación sistémica de PTZ (126,127); un modelo animal experimental fue desarrollado en ratas de 28 días de edad, a las cuales se les administrarán 30mg/Kg de PTZ por vía intraperitoneal, una vez al día durante 28 días consecutivos, se les dejó descansar durante una semana y se retrataron con la misma dosis de PTZ para inducir el kindling químico, desarrollándose Kindling en el 74% de los casos, presentando crisis conductuales y descargas EEG sincronizadas (128).

Al tratar las crisis convulsivas generalizadas inducidas con PTZ con Fenitoína y Carbamacepina no se obtienen buenos resultados; en cambio se obtienen resultados adecuados al tratar estas crisis con Valproato de sodio, Diazepam, Clonazepam, Trimetadiona, y Fenobarbital (129,130).

Generalidades de la evaluación preclínica y clínica en estudios de toxicidad

Los ensayos farmacológicos y toxicológicos requieren de animales de laboratorio de muy buena calidad y debidamente cuidados, proporcionados por un bioterio (cajas de contención de acuerdo a la especie y número de animales que se alojen, esterilización de lechos “viruta”, temperatura, humedad controlada $55 \pm 15\%$, renovación de aire, iluminación) (131), controlando su micro y macroambiente para asegurar su buen estado de salud y alimentación adecuada (132,133).

La especie animal a utilizar varía de acuerdo al objetivo de experimentación entre los animales más comunes para experimentación se encuentran: ratón (BALB C, NIH, C57 BLACK, CFW), rata, conejo, cobayo, gato, perro, mono, etc.



área de roedores dentro del bioterio.

Los estudios pueden ser agudos (corta duración) o crónicos (larga duración); la mayoría de los estudios están diseñados para poder determinar la dosis efectiva media (DE_{50}), la dosis letal media (DL_{50}) de una sustancia, cuya precisión se mejora aumentando el número de animales de prueba (n) y se considera como una expresión derivada estadísticamente de la dosis única de una sustancia que se espera que produzca el 50% de cierto efecto biológico en los animales del estudio, además de que nos pueden indicar el probable órgano blanco, de preferencia se seleccionan roedores debido a su economía, fácil adquisición y manejo (73,134).

La vía de administración, se elige de acuerdo a la que se utilizará en humanos. La vía oral es la más usual.

El medio de disolución de la muestra por si mismo no debe de tener ningún efecto tóxico y no debe de reaccionar, el más común es agua destilada, en ocasiones se puede utilizar también solución salina (suero fisiológico).

Antes de que la FDA o las autoridades sanitarias correspondientes (148), aprueben la utilización clínica de las sustancias experimentales y/o fármacos, la legislación vigente requiere la presentación de datos preclínicos y clínicos que sean una muestra evidente de seguridad y eficacia (102,120,121).

Investigación preclínica (estudios controlados en animales)

Cada vez hay más atención en la utilización de animales de laboratorio como objetos de experimentación y enseñanza de una manera ética y apegada a las buenas prácticas de laboratorio, para hacer sufrir lo menos posible a los animales (83,135); pese a que este es el mecanismo que ha permitido continuar con los avances médicos.

Los estudios de toxicidad en animales deben preceder a la exposición humana al fármaco. Aunque la FDA no ha propuesto orientaciones específicas para realizar los estudios de toxicidad en animales, existen algunas reglas (las buenas prácticas de laboratorio) que rigen el modo de realización y documentación de este tipo de estudios.

En todos los ensayos con animales destacan dos principios básicos: 1) los efectos de las sustancias bioactivas en los animales de laboratorio, con las debidas consideraciones son aplicables al hombre, 2) el empleo de dosis altas en los animales es un método necesario y válido para descubrir la posible toxicidad en el hombre. Puesto que el número de animales utilizados en los estudios de toxicidad es relativamente pequeño y el interés se centra en detectar respuestas tóxicas de baja incidencia, deben administrarse dosis superiores con el fin de validar la extrapolación al hombre (83,135).

Para ello se requiere del establecimiento de los modelos farmacológicos preclínicos, diseñados para establecer los patrones conductuales (locomotrices) además de los registros electrofisiológicos correspondientes a la posible actividad anticonvulsiva de los diferentes extractos naturales, obtenidos de los rizomas del género valeriana, así como las valoraciones analíticas de la biodisponibilidad, concentración estacionaria y depuración de los diferentes compuestos bioactivos probados de manera experimental y particularmente determinar cual es la dosificación adecuada de acuerdo al tratamiento específico abordando su estudio desde 3 disciplinas diferentes:

- Fitoquímica
- Farmacología
- Toxicología

Los estudios en animales empleados para determinar o definir la seguridad de una sustancia (fármaco) incluyen estudios de toxicidad aguda, subcrónica y crónica en diversas especies. Los estudios iniciales de toxicidad aguda permiten determinar la dosis letal media (DL_{50}), los síntomas tóxicos que aparecen en los animales y el tiempo que tardan en aparecer. Habitualmente se utilizan por lo menos 3 especies de animales, una de las cuales no es un roedor; la toxicidad aguda se determina por más de una vía de administración. En los últimos años se ha reducido el número de animales utilizados para determinar las DL_{50} , lo que también ha disminuido la precisión. Se ha reconocido que esta precisión no es necesaria para la evaluación global de la toxicidad en la especie humana. Los estudios iniciales dan una idea sobre las diferencias entre las especies, la naturaleza de los efectos tóxicos, el tiempo de aparición y las dosis necesarias para observar estos efectos dañinos. Sin embargo, la DL_{50} tiene poco valor de predicción si no va acompañada de estudios a largo plazo que investiguen otras manifestaciones de la toxicidad que no sean la muerte, como los cambios conductuales (hiperexcitabilidad), alteraciones en el desplazamiento locomotriz ambulatorio(73).



ratón de laboratorio cepa CFW

Existe interés creciente por la realización de estudios *in vitro*, con una relación costo-eficacia, riesgo-beneficio superior que permitan predecir la toxicidad de las sustancias (fármaco) con mayor rapidez. Aunque los estudios de toxicidad *in vitro* todavía no se han reconocido ni se aceptan como sustitutos de los experimentos con animales y a pesar de que sólo se utilizan como información de apoyo en el proceso regulador, la industria farmacéutica los emplea para seleccionar compuestos químicos específicos para su posterior desarrollo *in vivo* y farmacológico. Estos métodos *in vitro* probablemente desempeñarán un papel cada vez mayor en la investigación Farmacológica y Fitofarmacológica (134,135).

La cromatografía (chromatos “color”, graphein “escritura”) es una de las técnicas analíticas más utilizadas por su gran versatilidad en cuanto a la separación, detección y cuantificación de compuestos (orgánicos e inorgánicos) se basa en la diferencia en las velocidades de migración de los compuestos de una mezcla al pasar a través de una determinada fase estacionaria FE (soporte sólido) aún cuando son arrastrados por una determinada fase móvil FM (eluyente). Así gracias a las diferencias de polaridad, afinidad entre las fases, a los cambios y combinaciones que puede llevar a cabo la muestra con ambas fases permite la adecuada separación de muestras complejas en una cromatoplaque.

El proceso de adsorción consiste:

La muestra aplicada en la capa fina (cromatofolio) es adsorbida en la superficie del material por la acción de fuerzas electrostáticas (fuerzas de Van der Waals, puentes de Hidrógeno, efectos inductivos, etc). Luego, cuando la capa es expuesta a un flujo por acción capilar del disolvente contenido en la cámara cromatográfica, se inicia una competencia de enlaces entre los sitios activos del adsorbente y la sustancia de interés contenida en la muestra con el disolvente.

Los materiales adsorbentes más utilizados en la Cromatografía de Capa Fina son:

- Silica gel es un polvo blanco (se utiliza en el 80% de las separaciones, ya que es un adsorbente regenerable); propiedades fisico-químicas: densidad relativa 2.10, solubilidad en agua < 0.1%.
- Óxido de Aluminio ó Alúmina es un polvo blanco, tamaño de malla 80-200 se presenta en forma ácida pH 4, neutra pH 7 ó básica pH 10; empleándose la mayoría de las veces la alúmina neutra para las separaciones no acuosas (141).
- Tierra Silíceá ó Kieselguhr
- Celulosa micro-cristalina
- Poliamidas

Estos adsorbentes como (Al_2O_3 , SiO_2), deben tener las siguientes características: un tamaño de partícula adecuado según el diámetro y volumen del poro, área superficial, homogeneidad y pureza.

En general para la detección del corrimiento en la cromatoplaque se utiliza radiación ultravioleta (UV), su análisis cualitativo consiste en determinar su valor de R_f , la comparación visual del color ó intensidad de la mancha, así como de las propiedades espectroscópicas de los analitos contenidos en la muestra (65,142,143,144).

III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Epilepsia es un desorden neurológico con un gran número de pacientes con esta afección; diversas instancias como la OMS la reconocen ya como un problema de salud pública a nivel mundial ya que se encuentran afectados alrededor de 40 a 50 millones de personas en el mundo (156). La incidencia anual de esta neuropatología se estima en 100 000 pacientes a nivel mundial; los datos epidemiológicos, indican que su prevalencia es de 1-2%, estos datos en su mayoría corresponden al análisis de pacientes que están bajo supervisión médica continua, pero que desgraciadamente sólo incluye a las personas más severamente afectadas (7).

No todos los pacientes responden de manera satisfactoria a los tratamientos médicos convencionales ya que padecen un tipo de Epilepsia refractaria (resistente a los tratamientos médicos convencionales), por lo que necesitan de otro tipo de alternativas de tratamiento, como podría ser la fitofarmacología.

Se ha confirmado a través de diversos estudios fitofarmacológicos la presencia de metabolitos bioactivos en las especies del género *Valeriana*, que pudieran tener actividad a nivel del SNC (14,18,98,138). Dentro de los textos de herbolaria popular se encuentran descritos sus usos como sedante, tranquilizante e hipnótico, disminuye la irritabilidad y ayuda en el insomnio, antihipertensivo, antiespasmódico, antidepresivo (136).

No existen a la fecha suficientes estudios para la *Valeriana edulis ssp procera*, por lo tanto, con el presente proyecto de investigación se pretende establecer si esta especie ejerce un efecto biológico (anticonvulsivo) en el modelo murino convulsivo con PTZ.

IV OBJETIVOS

Objetivo general:

Establecer si la raíz de *Valeriana edulis ssp procera* presenta actividad como agente antiepiléptico en el modelo de convulsiones inducidas por el pentilentetrazol (PTZ) en el modelo experimental *in vivo* en ratón.

Objetivos específicos:

- Obtener los extractos acuoso (EA) e hidroalcohólico (EHE) (etanol al 70%, existen reportes sobre la preparación de tinturas, elixires) del rizoma de *Valeriana edulis ssp procera*.
- Encontrar la dosis efectiva media para un tratamiento anticonvulsivo en el modelo farmacológico preclínico para el EA y el EHE.
- Evaluar la actividad anticonvulsiva de los extractos del rizoma de la *Valeriana edulis ssp procera*.
- Determinar en cuál fracción de los extractos existe actividad anticonvulsiva; a través de estudios conductuales en ratones machos de la cepa CFW de 12 a 14 semanas de edad y con un peso aproximado de 25 g, usando el modelo convulsivo de pentilentetrazol (PTZ).
- Llevar acabo el fraccionamiento parcial del extracto que muestre mayor actividad en el modelo conductual del ratón.
- Establecer la actividad toxicológica de las fracciones con actividad anticonvulsiva en el modelo de la actividad locomotriz ambulatoria del ratón.

V METODOLOGÍA

Las muestras del rizoma de *Valeriana edulis ssp procera* en forma de polvo seco deshidratado y triturado fueron proporcionados por los laboratorios Mixim, los cuales tienen los protocolos necesarios para el control de calidad de estos productos naturales ya procesados (18), estas muestras corresponden a la cosecha del mes de mayo de 1999.

a) Preparación de los extractos

El extracto acuoso (EA) e hidroetanólico fresco (EHEf) y almacenado (EHEa) (18,98,112); se pesó en cada caso 1 g de la *Valeriana edulis ssp procera*:

- EA recién preparado se adicionaron 100 ml de agua destilada macerando durante 30' (extracto acuoso fresco), filtrar de inmediato desechando el residuo, el sobrenadante se envasó en un frasco ámbar y etiqueto.
- No se trabajó extracto acuoso almacenado ya que debía de ser preparado de inmediato, ya que de lo contrario le salían hongos a la solución.
- EHEf se adicionaron 100 ml de etanol al 70% (137) macerando durante 30' (extracto hidroetanólico fresco), filtrar de inmediato desechando el residuo, el sobrenadante se envasó en un frasco ámbar y etiqueto.
- EHEa se adicionaron 100 ml de etanol al 70% (137) macerando durante 30', se filtro de inmediato desechando el residuo y se envasó en un frasco ámbar bien tapado y etiquetado en un lugar seco y fresco durante 2 meses.

Ensayo con PTZ para determinar la actividad anticonvulsiva de los extractos

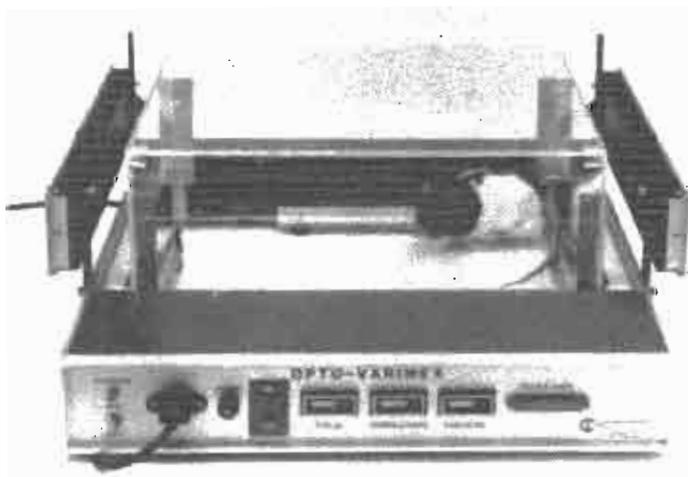
Se utilizaron ratones macho de la cepa CFW con un peso de 18 a 25 g (10 a 12 semanas de edad), los cuales se distribuyeron de manera aleatoria en diferentes grupos experimentales de 6 animales cada uno (8.118). Se les administraron:

1. Solución salina fisiológica, vía oral (n=6)
2. Solución hidroetanólica al 70% (137), vía oral (n=6)
3. EA a diferentes dosis (16.5,33,45,66,100 mg/Kg), vía oral (n=6)
4. EHEf a diferentes dosis (16.5,33,45,66,100 mg/Kg), vía oral (n=6).
5. EHEa a diferentes dosis (16.5,33, 45,66,100 mg/Kg), vía oral (n=6).
6. Treinta minutos después se administró el PTZ (50mg/Kg), vía subcutánea (n=6).
7. Se determinó la latencia de la primera crisis generalizada, el número total de crisis, su duración, la letalidad, en cada uno de los grupos experimentales.

Ensayo de desplazamiento de la actividad locomotriz ambulatoria

Para esta prueba se empleó otro grupo de ratones de las mismas características y nuevamente se distribuyó al azar en varios grupos para evaluar las diferentes dosis de EA y EHE tanto fresco como almacenado, cada uno de los animales se introdujo por 5 minutos al equipo OPTO-VARIMEX MINITOR Columbus Instruments, el cual consta de haces de rayos infrarrojo a los lados para medir el desplazamiento horizontal, vertical y ambulatorio de los ratones y un contador automático e independiente para cada uno de estos movimientos, para que tuviera un pequeño período de acostumbramiento al nuevo ambiente y posteriormente se procedió a la:

- Administración oral de la solución salina fisiológica (n=6).
- Administración oral de la solución hidroetanólica al 70% (137) (n=6).
- Administración oral del EA a diferentes dosis: 16.5, 33, 45, 66, 100 mg/Kg. (n=6).
- Administración oral del EHEf a diferentes dosis (16.5, 33, 45, 66, 100 mg/Kg) (n=6).
- Administración oral del EHEa a diferentes dosis (16.5, 33, 45, 66, 100 mg/Kg) (n=6).



Se trabajó en el mismo horario que la prueba del efecto anticonvulsivo y se administró la dosis correspondiente de los EA y EHE de *Valeriana edulis ssp procera* 30 minutos antes de comenzar la prueba, se dejó un pequeño período de acostumbramiento al nuevo ambiente para el ratón (5 min.) y se procedió a realizar el registro del desplazamiento dentro del aparato por un período de tiempo de 5 minutos para cada uno de los ratones.

Fraccionamiento parcial

Se llevó a cabo el fraccionamiento parcial de los extractos que presentaron mayor actividad antiepiléptica, de acuerdo al diseño del experimento de la actividad anticonvulsiva de los extractos con el PTZ.

Análisis cromatográfico

Se realizó el análisis cromatográfico en capa fina para determinar el número de manchas presentes en cada extracto del rizoma de la *Valeriana edulis ssp procera*.

- Se aplicó en cromatoplasmas de SiO₂, Al₂O₃ muestras de soluciones recién preparadas de *Valeriana edulis* en diferentes disolventes como: a) sol. acuosa, b) sol. hidro-alcohólica al 70% (137), c) sol. hidro-alcohólica al 70% (137) almacenada, corriendo las placas en los sistemas cromatográficos Hexano: Acetato de Etilo, Hexano : Metil etil cetona (144,145) a fin de seleccionar el sistema de eluyentes que permitiera llevar a cabo el fraccionamiento parcial propuesto en los objetivos específicos, desarrollando una técnica de extracción selectiva que proporcione:

- Obtención de la fracción acuosa
- Obtención de la fracción orgánica
- Obtención del residuo, los cuales se evaporan hasta sequedad en el rotavapor a 60°C (102) y se conservan en un lugar fresco y seco hasta el momento de su resuspensión en solución salina isotónica antes de ser inyectados a los ratones de la misma manera en que se hizo el ensayo del efecto anticonvulsivo.

- Prueba de la actividad anticonvulsiva de cada una de las fracciones anteriores, en otro lote de ratones.

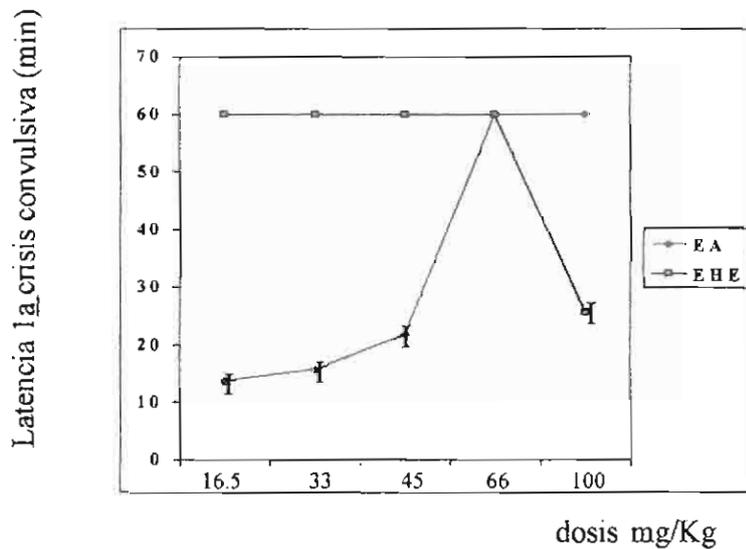
f) Análisis estadístico de los resultados de cada uno de los ensayos anteriores

Los datos experimentales se cargaron en una base de datos y se analizaron estadísticamente por medio del paquete SPSS versión 8.0 para Windows, aplicándose diferentes tipos de pruebas para poder comparar entre si todos los grupos experimentales en cada prueba: realizándose la prueba de homogeneidad de varianzas (prueba de Levene) para establecer la pertinencia de usar una prueba de ANOVA paramétrica. Se realizaron también las pruebas de comparaciones múltiples para una sola vía (ANOVA), Tukey y Xi cuadrada de Pearson, valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos. En todos los casos, el tamaño de muestra fue suficiente para detectar diferencias significativas.

En el caso de que no hubiera homogeneidad de varianza se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Mann-Whitney para cuantificar las diferencias estadísticamente significativas.

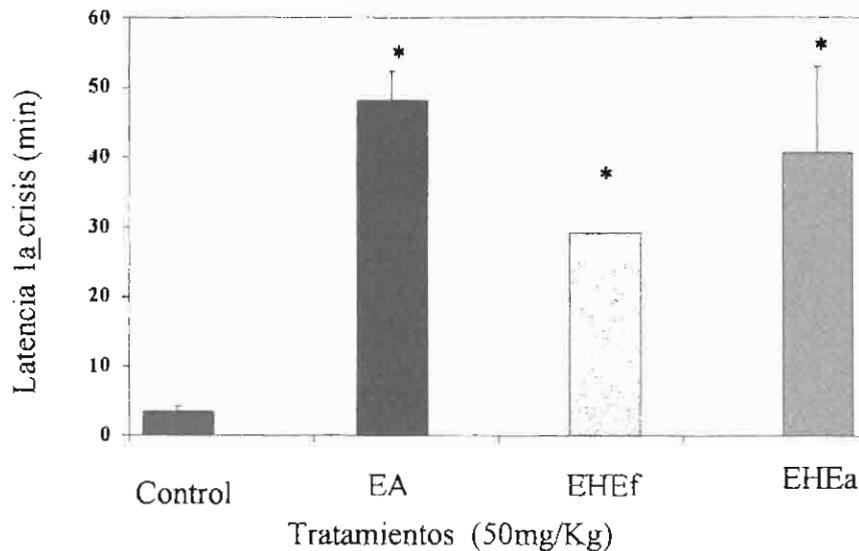
VI RESULTADOS

Curva dosis efecto de la *Valeriana edulis*



Gráfica 1. La curva dosis efecto de la *Valeriana edulis* se determinó experimentalmente al probar las dosis de 16.5, 33, 45, 66 y 100 mg/Kg utilizando los dos tipos de extractos (EA y EHE), en diferentes grupos de ratones macho de la cepa CWF, en el eje de las "x" tenemos la las diferentes dosis en mg/Kg, mientras que en el eje de las "y" se tiene latencia a la primera crisis convulsiva (min) encontrándose el mejor perfil de comportamiento con el EA ya que presenta la curva sigmoidea típica.

Estudio preliminar del posible efecto anticonvulsivo de los extractos de *Valeriana edulis*



Gráfica 2. En un estudio preliminar se obtuvo el efecto anticonvulsivo al evaluar la dosis de 50 mg/Kg de los diferentes extractos del rizoma de la *Valeriana edulis*. Con todos los tratamientos se observó un aumento del efecto anticonvulsivo a través del incremento en la latencia a la primera crisis convulsiva habiendo diferencias estadísticamente significativas a través de la prueba de comparaciones múltiples para una sola vía (ANOVA), Tukey (* $p < 0.05$) al compararlos contra el grupo control.

Actividad anticonvulsiva de los extractos de *Valeriana edulis*

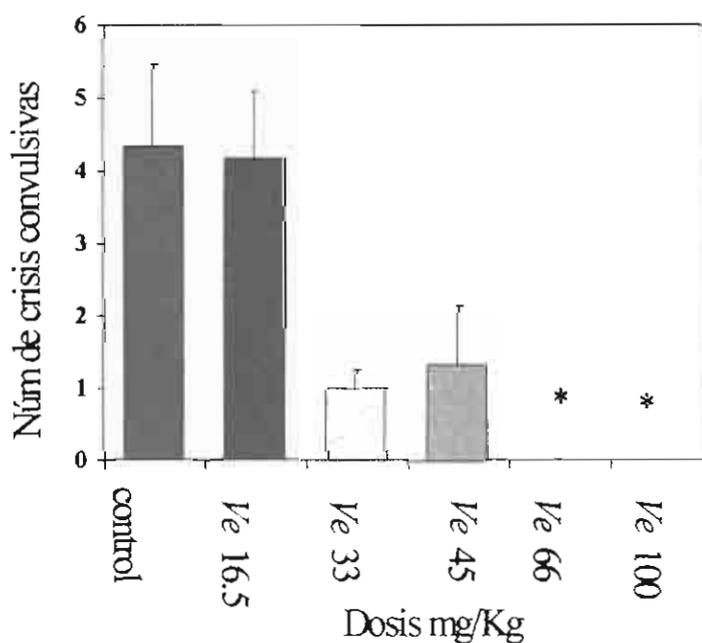
En el modelo experimental para estudiar la actividad anticonvulsiva se observó que al administrar las diferentes dosis del EA del rizoma de la *Valeriana edulis* en el modelo murino de PTZ (50mg/Kg) ($n=6$). Se presentó una disminución en el número promedio de crisis convulsivas con cada una de las dosis evaluadas: 16.5, 33, 45 mg/Kg e incluso su desaparición con las dosis de 66, 100 mg/Kg, lo que demuestra la actividad anticonvulsiva de este producto etnobotánico, sin que se presente diferencia estadísticamente significativa.

Para la evaluación de la latencia de la primera crisis convulsiva (min) se observó un aumento dosis dependiente en la cual se presentaron diferencias estadísticamente significativas para las dosis de 45, 66, 100 mg/Kg. (* $p < 0.05$).

Durante la evaluación de la duración de las crisis convulsivas (min) se observó una tendencia de disminución del efecto, con cada una de las dosis estudiadas; presentándose diferencia estadísticamente significativa para las dosis de 33, 45, 66, 100 mg/Kg.

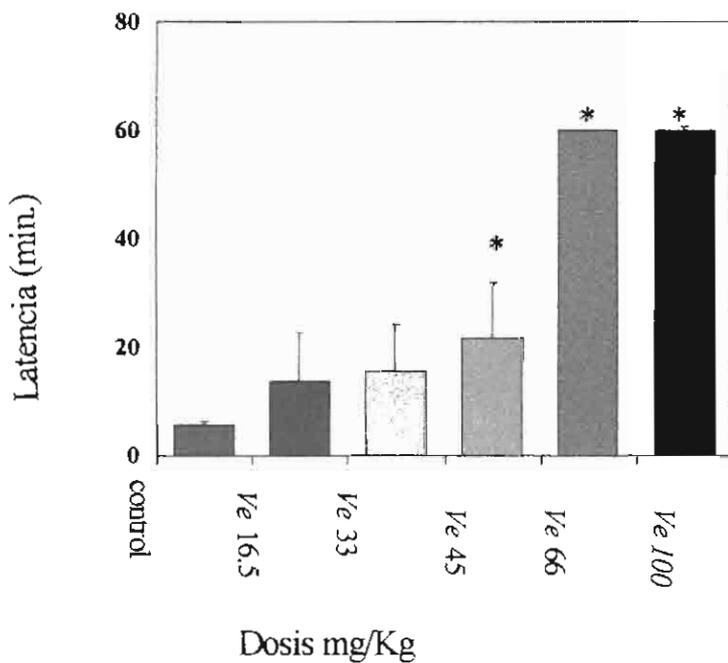
Para la evaluación de la letalidad: En el grupo control murieron todos los ratones (6/6) y al administrar la dosis de 16.5 mg/Kg del rizoma de la *Valeriana edulis* por vía oral 30 minutos antes de la administración subcutánea del agente neurotóxico, murieron (4/6) lo que corresponde al 66.6% de los ratones, y con el resto de las dosis probadas se presentó una sobrevivencia del 100% y hubo diferencias estadísticamente significativas con respecto del grupo control (** p < 0.01).

Número de crisis convulsivas EA *Valeriana edulis*



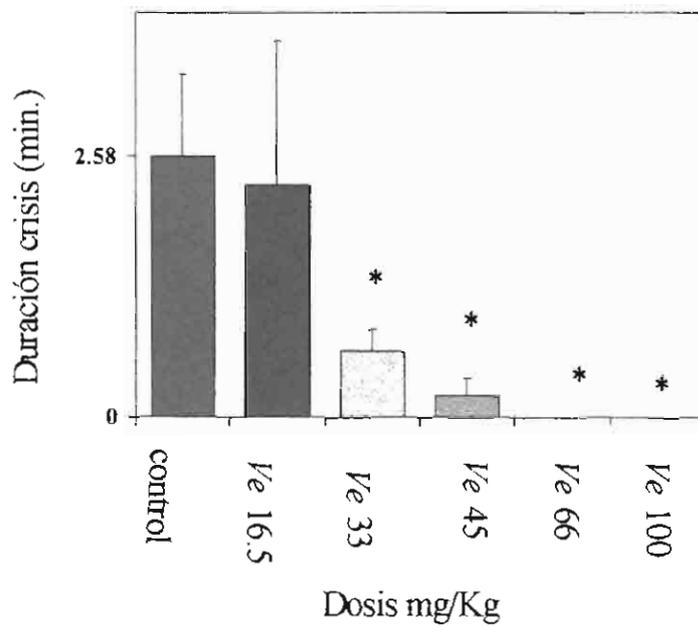
Gráfica 3. Se observó una disminución en el número promedio de crisis convulsivas con cada una de las dosis del EA del rizoma de la *Valeriana edulis* (Ve) evaluadas: 16.5, 33, 45 mg/Kg e incluso su desaparición con las dosis de 66, 100 mg/Kg, lo que nos indica su efecto anticonvulsivo presentando diferencia estadísticamente significativas (* p < 0.05) al realizar la prueba de comparaciones múltiples para una sola vía (ANOVA), Tukey.

Efecto del EA de *Valeriana edulis* sobre la latencia de la primera crisis convulsiva.



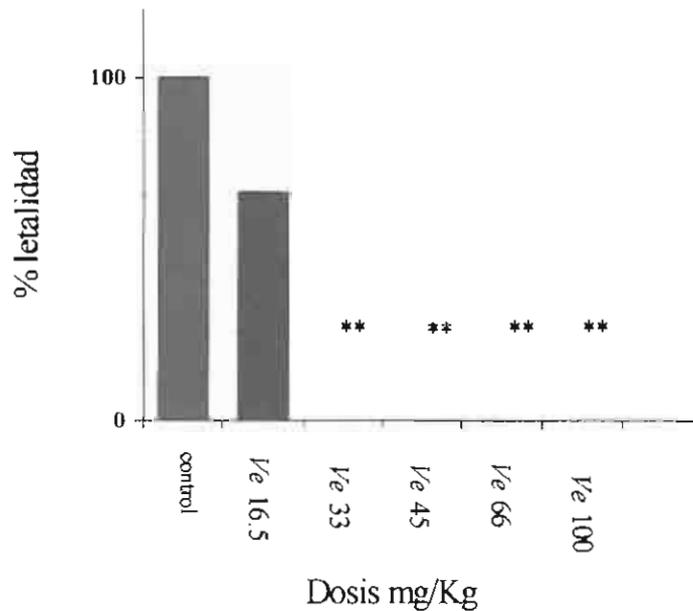
Gráfica 4. Al hacer el análisis estadístico de la latencia de la primera crisis convulsiva del EA del rizoma de la *Valeriana edulis* (Ve) a sus diferentes dosis, a través de las comparaciones múltiples para una sola vía (ANOVA) y Tukey, se observó un aumento en la latencia a la primera crisis convulsiva (min) dosis dependiente, teniendo diferencias estadísticamente significativas para las dosis de 45, 66, 100 mg/Kg con respecto al grupo control (* $p < 0.05$), además de presentarse un efecto máximo con las dosis de 66 y 100 mg/Kg.

Duración de las crisis convulsivas EA de *Valeriana edulis*



Gráfica 5. En la evaluación de la duración de las crisis convulsivas con el EA del rizoma de la *Valeriana edulis* se observó una disminución del efecto, de manera dosis dependiente, habiendo diferencias estadísticamente significativas para las dosis de 33, 45, 66 y 100 mg/Kg (* $p < 0.05$) a través de las comparaciones múltiples para una sola vía (ANOVA) y Tukey.

Porcentaje del efecto del EA de *Valeriana edulis* sobre la letalidad del PTZ



Gráfica 6. Al comparar la letalidad producida al probar cada uno de los tratamientos experimentales del EA, se encontró que en el grupo control murieron todos los ratones y al administrar la dosis de 16.5 mg/Kg del rizoma de la *Valeriana edulis* (Ve) murió el 66.6% de los ratones, mientras que para las demás dosis no hubo letalidad, presentándose diferencias estadísticamente significativas con las dosis de 33, 45, 66 y 100 mg/Kg (** $p < 0.01$) y con significancia en la Xi cuadrada de Pearson de (** $p < 0.05$).

Otra serie de animales se dividieron también de manera aleatoria para probar el efecto anticonvulsivo del EHEf del rizoma de la *Valeriana edulis* al 70%; después de su administración por vía oral, los animales mostraron cambios en su comportamiento tales como: sedación, disminución de su actividad locomotriz, respiración acelerada, se arrinconaron, lo cual dificultó la determinación del efecto biológico deseado; una vez transcurrido el periodo de observación (1 hr.) volvieron a su comportamiento normal.

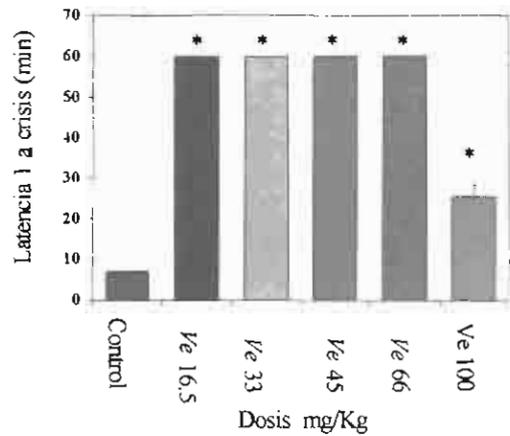
En los resultados obtenidos experimentalmente (n=6) al evaluar los EHEf del rizoma de la *Valeriana edulis* al 70% a las diferentes dosis en el modelo murino de PTZ, se determinó el número promedio de crisis convulsivas, su latencia, duración y la letalidad. La prueba estadística aplicada fue comparaciones múltiples para una sola vía (ANOVA) y Tukey, (* $p < 0.05$) se consideraron estadísticamente significativos, para la letalidad se aplicó la prueba de Xi cuadrada de Pearson.

Para la evaluación de la latencia de la primera crisis convulsiva (min) se observó un incremento para esta variable con todas las dosis administradas, lo cual se puede atribuir al efecto enmascarante que tiene el alcohol sobre la determinación de las crisis convulsivas.

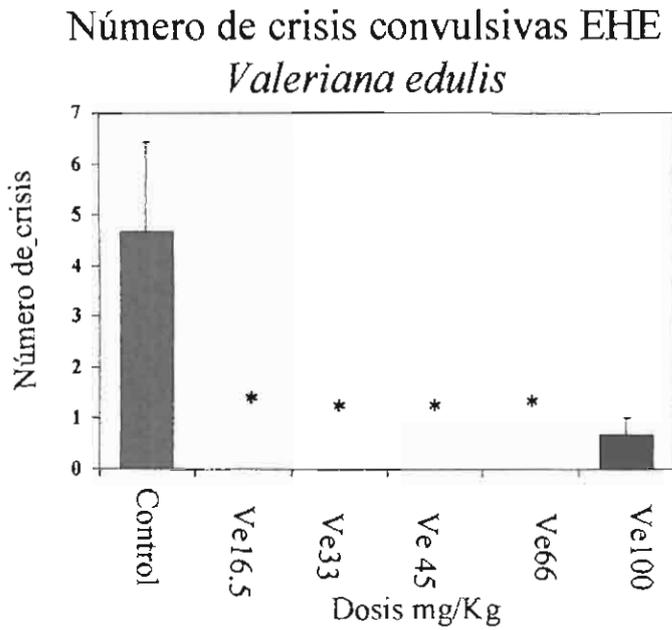
Para la evaluación del número promedio de crisis convulsivas y su duración (min) se observó su desaparición con las dosis de 16.5, 33, 45, 66 y una disminución con la dosis de 100 mg/Kg, lo cual no podemos asegurar que sea el efecto anticonvulsivo del EHE, por lo ya descrito anteriormente.

En lo que respecta a la determinación de la letalidad, con el control todos los ratones murieron (6/6), mientras que con las dosis de 16.5, 33, 45, 66 hubo una sobrevivencia del 100% (0/6) y con la dosis de 100 mg/Kg hubo una letalidad del 50% (3/6), a través de la Xi cuadrada de Pearson.

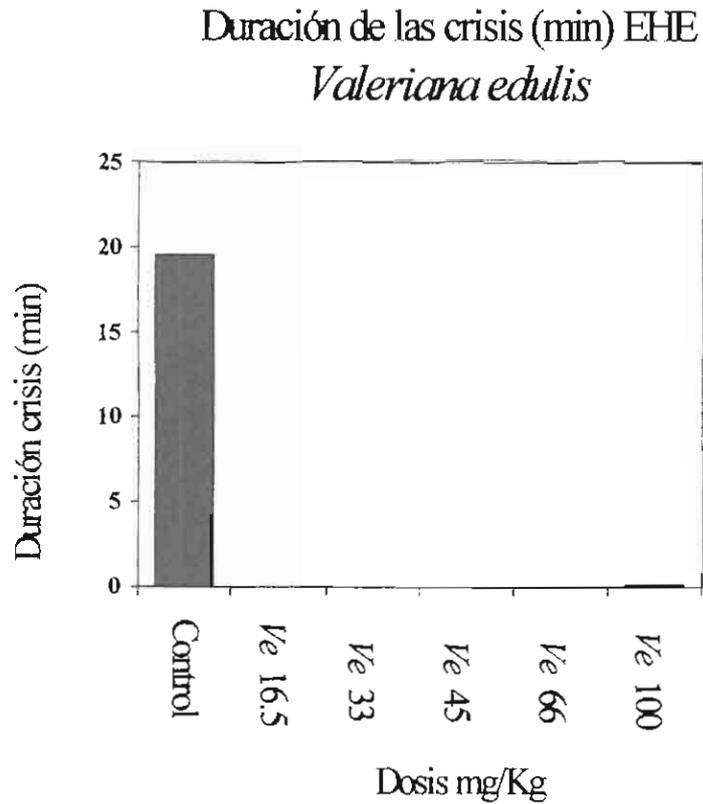
Latencia 1ª crisis convulsiva EHE *Valeriana edulis*



Gráfica 7. Se observa que hay un incremento en la latencia a la primera crisis convulsiva con todas las dosis del EHEf del rizoma de *Valeriana edulis*, habiendo diferencias estadísticamente significativas a través de las comparaciones múltiples para una sola vía (ANOVA) y Tukey (* $p < 0.05$) al compararlas con el grupo control e incluso para las dosis que van de 16.5 hasta 66 mg/Kg, esta latencia superó el período de observación.

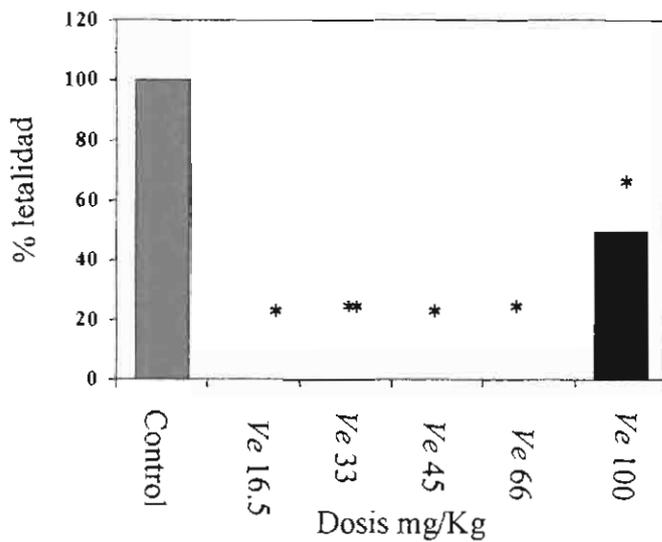


Gráfica 8. Al observar el número promedio de crisis convulsivas que se produjeron después de la aplicación de las diferentes dosis del EHE de *Valeriana edulis*, en el modelo experimental de PTZ, se apreció que a partir de la dosis de 16.5 y hasta la dosis de 66 mg/Kg se suprimió completamente la aparición experimental de las crisis, habiendo diferencias estadísticamente significativas a través de las comparaciones múltiples para una sola vía (ANOVA) y Tukey (* $p < 0.05$), lo que demuestra la eficacia del tratamiento anticonvulsivo; mientras que con la dosis de 100 mg/Kg el número promedio de crisis fue muy pequeño.



Gráfica 9. Se observa que al haberse suprimido completamente las crisis convulsivas con las dosis de 16.5 hasta 66 mg/Kg, no hay ninguna duración del evento y con la dosis de 100 mg/Kg el promedio de duración de las crisis fue muy pequeño (0.17) por lo que el tratamiento es efectivo, se aplicó la prueba de las comparaciones múltiples para una sola vía (ANOVA) y Tukey sin que se presentaran diferencias estadísticamente significativas.

Porcentaje de letalidad EHE *Valeriana edulis*

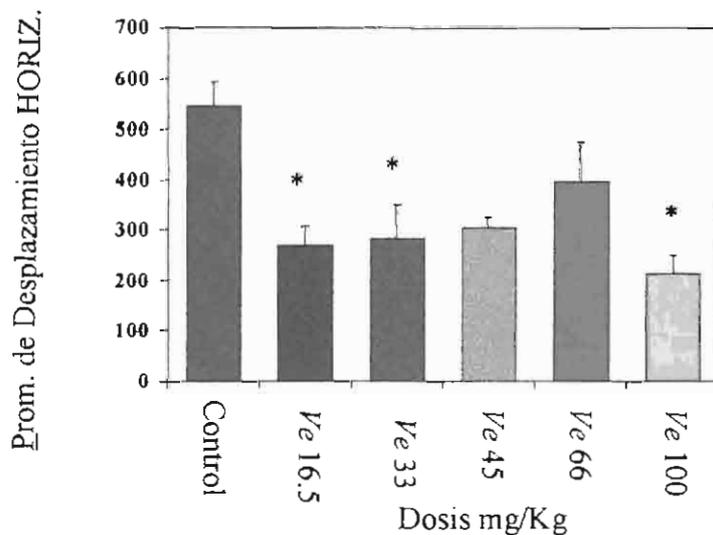


Gráfica 10. Para el grupo control la letalidad fue del 100% (6/6) y para los grupos experimentales tratados con el EHE del rizoma de la *Valeriana edulis* con las dosis de 16.5 a 66 mg/Kg se logró suprimir la letalidad (0/6), lo que nos está indicando el efecto protector de las dosis probadas, para la dosis de 100 mg/Kg la letalidad fue del 50% (3/6) en todos los casos se presentaron diferencias estadísticamente significativas ya que la Xi cuadrada de Pearson (* $p < 0.05$).

Evaluación de la toxicidad neuro motriz de los EA del rizoma de *Valeriana edulis*.

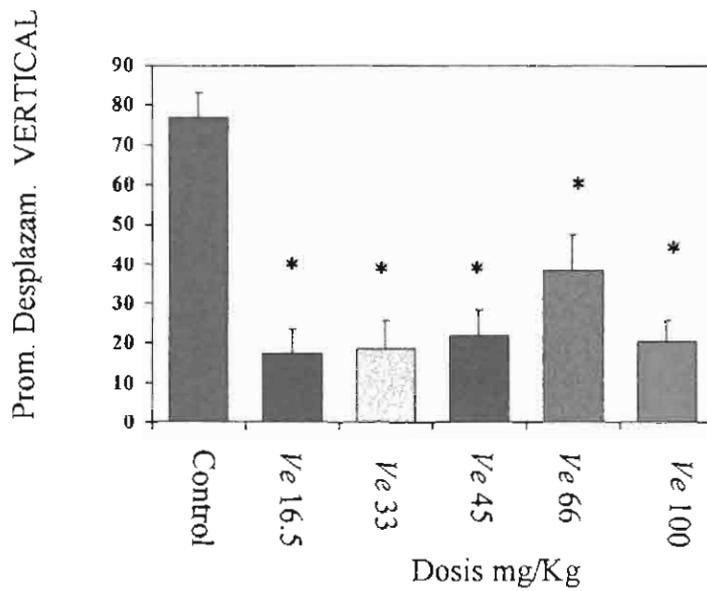
Se encontró el efecto tóxico del EA del rizoma de la *Valeriana edulis* (n=6), a las diferentes dosis evaluadas, presentándose una disminución en el valor promedio del desplazamiento horizontal de manera dosis dependiente de 16.5 a 66 mg/Kg, teniendo diferencia estadísticamente significativa con las dosis de 16.5, 33, 100 mg/Kg con respecto del grupo control (*p < 0.05). En la evaluación del desplazamiento vertical hay una disminución en el valor promedio del efecto de manera dosis dependiente con todas las dosis excepto la de 100 mg/Kg la cual también muestra una disminución en dicho desplazamiento, habiendo diferencias estadísticamente de todas las dosis con respecto a su control (*p < 0.05). En la evaluación del desplazamiento promedio ambulatorio todas las dosis produjeron una disminución en el desplazamiento, sin que haya diferencias estadísticamente significativas. La prueba estadística aplicada fue comparaciones múltiples para una sola vía (ANOVA) y Tukey, valores de p < 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

Desplazamiento horizontal EA *Valeriana edulis*



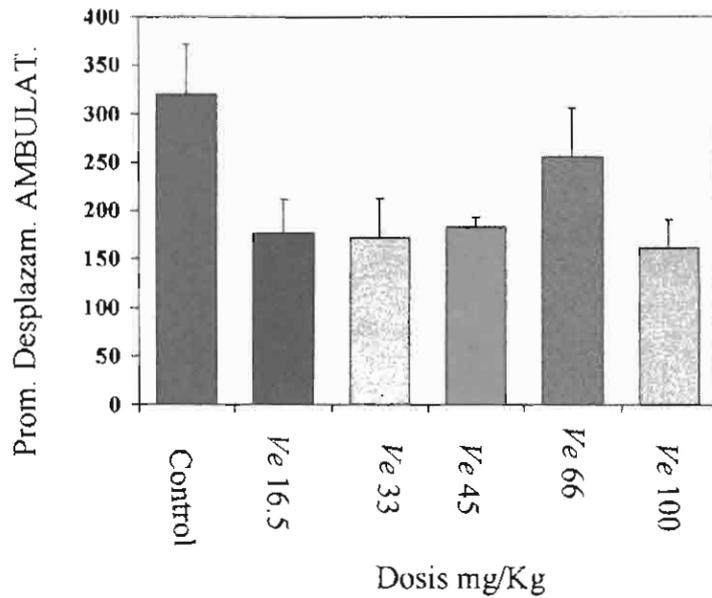
Gráfica 11. Al llevar a cabo la evaluación de la actividad locomotriz ambulatoria en el eje de las "y" al probar las diferentes dosis del EA del rizoma de la *Valeriana edulis* en el eje de las "x", se observó experimentalmente que en el promedio del desplazamiento horizontal se presentó una disminución de los valores promedio de cada dosis al compararlas con el grupo control y hubo diferencias estadísticamente significativas con las dosis de 16.5, 33 y 100 mg/Kg a través de las comparaciones múltiples para una sola vía (ANOVA) y Tukey (* p < 0.05).

Desplazamiento vertical EA *Valeriana edulis*



Gráfica 12. Durante la evaluación de la toxicidad neuro motriz del EA del rizoma de *Valeriana edulis*, se encontró que en el valor promedio del desplazamiento vertical hubo una disminución para cada una de las dosis estudiadas al ser comparadas contra el grupo control, teniendo diferencias estadísticamente significativas con todas las dosis excepto la de 66 mg/Kg a través de las comparaciones múltiples para una sola vía (ANOVA) y Tukey (* $p < 0.05$).

Desplazamiento ambulatorio EA *Valeriana edulis*



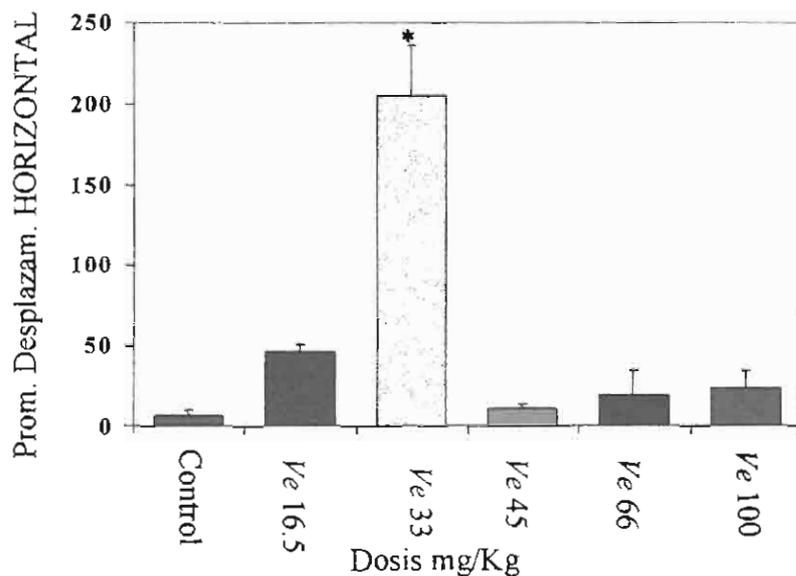
Gráfica 13. Durante la evaluación del desplazamiento ambulatorio para la prueba de neuro toxicidad motriz con el EA del rizoma de la *Valeriana edulis* a las diferentes dosis estudiadas, todas presentaron una disminución en el valor promedio para este movimiento con respecto al grupo control, sin que se hayan presentado diferencias estadísticamente significativas a través de las comparaciones múltiples para una sola vía (ANOVA) y Tukey.

Evaluación de la toxicidad neuro motriz con el EHE del rizoma de *Valeriana edulis*.

De acuerdo con los resultados de la evaluación de la toxicidad al administrar el EHEf del rizoma de *Valeriana edulis* a las diferentes dosis (n=6).

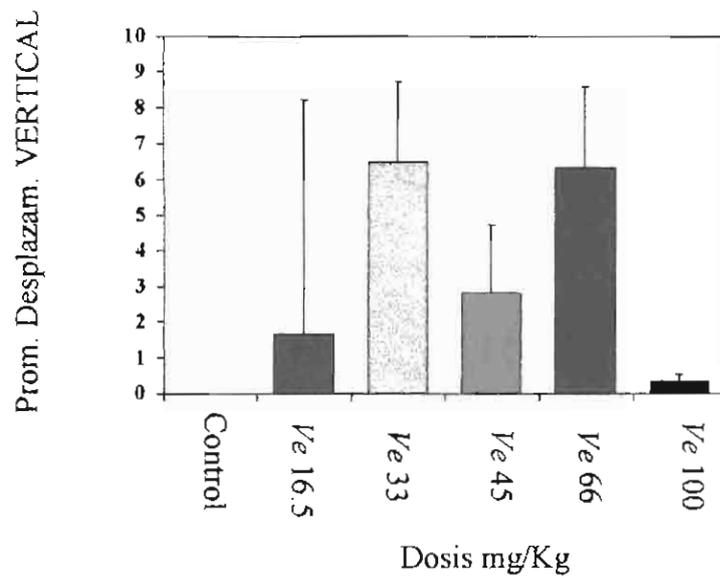
Se presentó una menor movilidad del lote control que contenía exclusivamente la solución hidroetanólica al 70% debido al efecto depresor de esta sustancia sobre el SNC y al compararlo con las demás dosis del EHEf del rizoma de la *Valeriana edulis* se observó un incremento en cada uno de los desplazamientos con respecto del grupo control. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0.05$) para la dosis de 33 mg/Kg en el desplazamiento horizontal y el desplazamiento ambulatorio. La prueba estadística aplicada fue comparaciones múltiples para una sola vía (ANOVA) y Tukey, valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Desplazamiento horizontal EHE *Valeriana edulis*



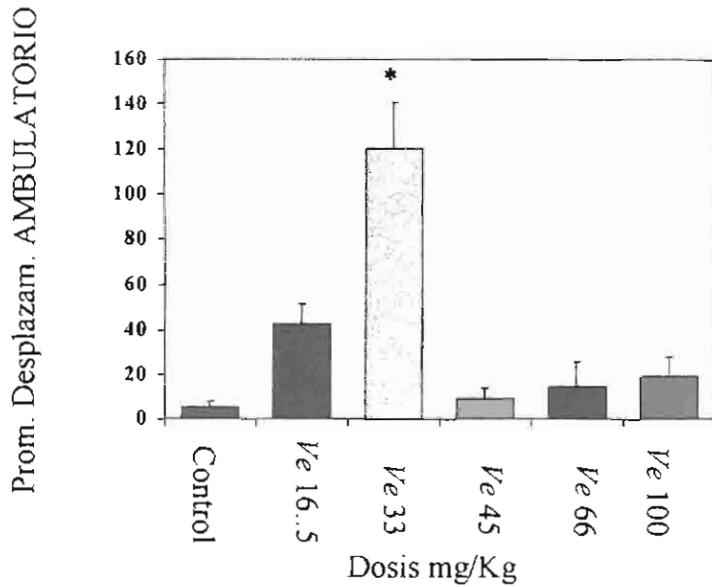
Gráfica 14. En la evaluación de la neuro toxicidad motriz con el EHEf del rizoma de la *Valeriana edulis* a sus diferentes dosis, se presentó un incremento con todas las dosis estudiadas para el desplazamiento horizontal, la dosis de 33 mg/Kg fue la única que presentó diferencia estadísticamente significativa a través de las comparaciones múltiples para una sola vía (ANOVA) y Tukey (* $p < 0.05$) al compararlas contra el grupo control.

Desplazamiento vertical EHE *Valeriana edulis*



Gráfica 15. Con todas las dosis probadas se presentó un incremento en el promedio para el desplazamiento vertical con respecto al grupo control que permaneció inmóvil tal vez debido al efecto depresor del alcohol, sin que haya diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en estudio a través de las comparaciones múltiples para una sola vía (ANOVA) y Tukey.

Desplazamiento ambulatorio EHE *Valeriana edulis*



Gráfica 16. En la evaluación de la toxicidad neuro motriz del EHE del rizoma de la *Valeriana edulis* se presentó un incremento para el desplazamiento ambulatorio con todas las dosis estudiadas con respecto al grupo control, por lo ya explicado anteriormente respecto a la solución hidroetanólica sola y únicamente se presentó diferencia estadísticamente significativa a la dosis de 33 mg/Kg a través de las comparaciones múltiples para una sola vía (ANOVA) y Tukey (* $p < 0.05$).

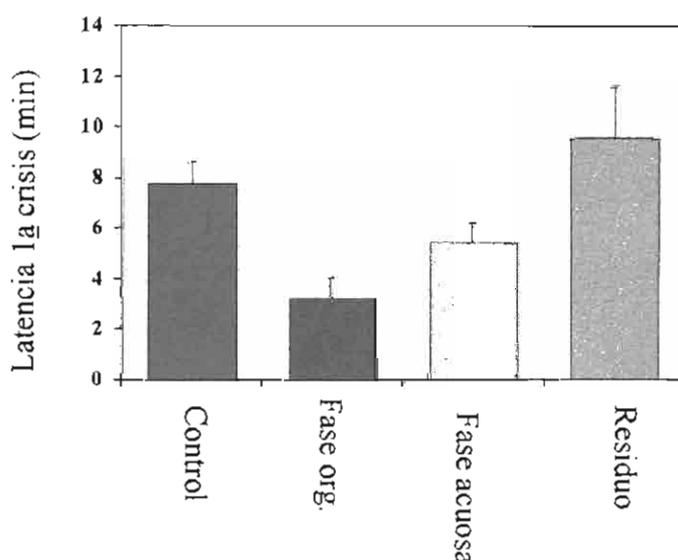
Análisis cromatográfico.

Experimentalmente la mejor placa cromatográfica es la de Sílica (SiO_2) ya que permite separar mayor número de manchas (6 ó 7) las cuales tienen un comportamiento que va de medianamente polar a polar.

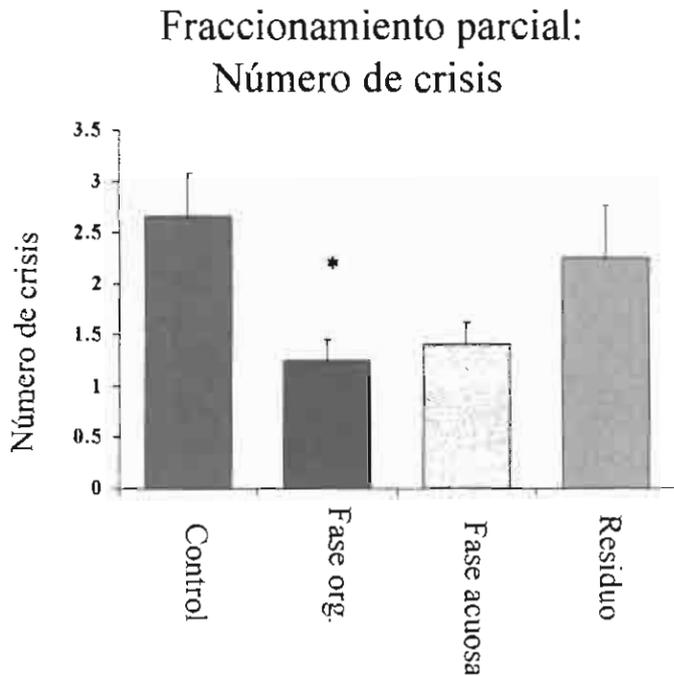
Fraccionamiento parcial del EA del rizoma de la *Valeriana edulis* y su evaluación farmacológica.

En la evaluación del efecto anticonvulsivo después de realizar el fraccionamiento parcial del EA recién preparado del rizoma de la *Valeriana edulis* (n=6), se observó que la latencia para la primera crisis convulsiva solamente se incremento para el residuo al compararlo contra el control sin que esto sea significativo estadísticamente, mientras que para el número de crisis en los tres casos hubo una disminución del valor con respecto al grupo control, la cual tampoco fue significativa. En cuanto a la evaluación de la duración de las crisis convulsivas hay una disminución del efecto y en donde hay diferencia estadísticamente significativa (*p < 0.05) entre el grupo control y el grupo tratado con la fase orgánica. Pero el único grupo donde no se presento muerte de los ratones fue el de la fase acuosa.

Fraccionamiento parcial: Latencia 1ª crisis

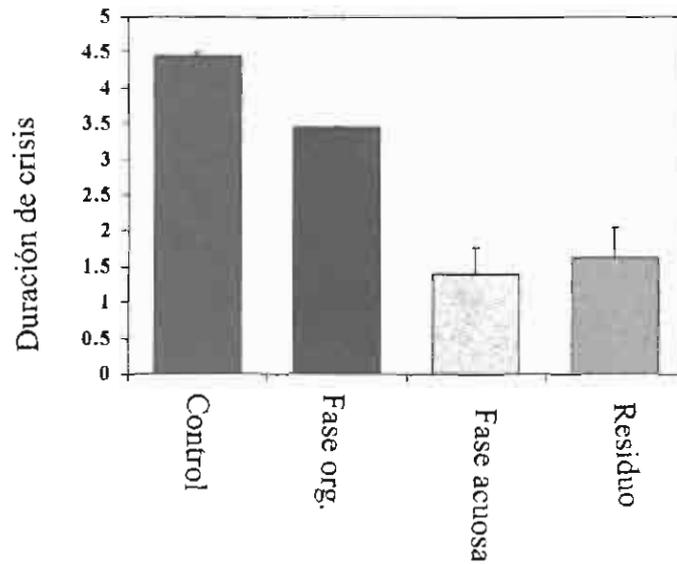


Gráfica 17. Después de haber llevado a cabo el fraccionamiento parcial del EA del rizoma de la *Valeriana edulis* y al probar su posible efecto anticonvulsivo se encontró una disminución en la latencia a la primera crisis convulsiva con las fases orgánica y acuosa, solamente se observó el incremento para este parámetro con el residuo, se aplicó la prueba de las comparaciones múltiples para una sola vía (ANOVA) y Tukey sin que se presentará ninguna diferencia estadísticamente significativa en ningún caso.



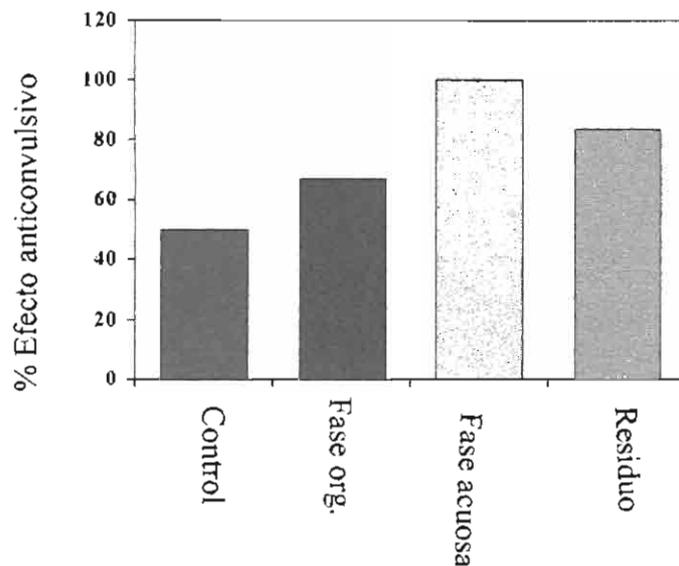
Gráfica 18. En lo que respecta al número de crisis convulsivas promedio que se presentaron durante la evaluación del fraccionamiento parcial selectivo del EA del rizoma de la *Valeriana edulis*, se pudo apreciar una disminución en el número de crisis convulsivas con las fases orgánica y acuosa, pero hubo un incremento de este parámetro con el residuo, encontrándose diferencia estadísticamente significativa entre la fracción orgánica y el control a través de las comparaciones múltiples para una sola vía (ANOVA) y Tukey (* $p < 0.05$).

Fraccionamiento parcial: Duración de crisis



Gráfica 19. Durante la evaluación de la duración de las crisis convulsivas con los productos obtenidos del fraccionamiento parcial del EA del rizoma de la *Valeriana edulis* se observó una disminución de la duración con las fases orgánica, acuosa y con el propio residuo. Sin que haya diferencias estadísticamente significativas a través de las comparaciones múltiples para una sola vía (ANOVA) y Tukey.

Fraccionamiento parcial :
Porcentaje del efecto anticonvulsivo



Gráfica 20. Durante la Evaluación farmacológica del EA del rizoma de la *Valeriana edulis* después de su fraccionamiento parcial selectivo, se pudo observar un efecto protector anticonvulsivo del 100% con la fase acuosa ya que ninguno de los animales estudiados murió ($n=6$), mientras que con el residuo se logró una protección del 83% y con la fase orgánica el efecto fue del 67%, en el grupo control el efecto fue del 50%. Sin que se hayan presentado diferencias estadísticamente significativas con respecto a la Xi cuadrada de Pearson ($p < 0.05$).

VII ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Los resultados experimentales fueron cargados en una base de datos y fueron analizados estadísticamente por medio del paquete SPSS , aplicándose diferentes tipos de pruebas como la comparación de medias para una sola vía, análisis de varianza, y al comparar dos grupos diferentes de población se llevó a cabo la prueba de Tukey, en el estudio de la letalidad se aplicó la prueba de Xi cuadrada de Pearson, para determinar si existe diferencia estadísticamente significativa entre todos los grupos en estudio (146,147).

Al contar con un grupo testigo “control” no se necesita comparar entre si todos los porcentajes, sino que se usa este grupo cuyo efecto ya es conocido para contrastar las porciones de respuesta obtenidos de los grupos tratados, como es el caso de la preparación de los extractos del rizoma de la *Valeriana edulis*, la evaluación de la actividad anticonvulsiva (ver gráficas 3,4,5,6,7,8,9,10).

En estos métodos estadísticos de comparaciones múltiples con el análisis de se puede llegar a la conclusión de aceptar ó rechazar la hipótesis nula de igualdad de las medidas; en el caso de rechazarla, se sabe que al menos existe una diferencia estadísticamente significativa entre algún par de medidas, pero no nos indica cual es el par que es diferente; por lo tanto es necesario hacer otro tipo de pruebas como la *t* de Student para dos muestras independientes, pero tiene el inconveniente que se ignora la distribución de la variable dependiente sobre los demás grupos, por lo que se recomienda de otro tipo de prueba como es el método de Tukey en donde se requieren tamaños de muestras iguales, siendo un método exacto y potente para dicho fin (73,109), que contiene la comparación entre el los EHEf y EHEa, así mismo en el caso de los ensayos de la actividad locomotriz (ver gráficas 11,12,13,14,15,16).

VIII DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De acuerdo con los resultados experimentales obtenidos en los ensayos preliminares se aprecia que tanto el EA como los EHEf y EHEa tienen propiedades anticonvulsivas ya que aumentaron la latencia a la primera crisis convulsiva (ver gráficas 1,2).

El EA del rizoma de la *Valeriana edulis* aumentó la latencia a la primera crisis convulsiva (ver gráfica 4) y disminuyó el número de crisis convulsivas e incluso llegó a suprimir las crisis convulsivas con las dosis de 66 y 100 mg/Kg (ver gráfica 3), la duración de las crisis convulsivas fue disminuyendo con cada dosis probada demostrando así su eficacia anticonvulsiva en el modelo de PTZ en ratón (ver gráfica 5), al comparar el efecto de la letalidad para esta prueba se observó que la dosis menos apropiada fue la de 16.5 mg/Kg ya que presentó una letalidad del 67% (ver gráfica 6).

Al evaluar el efecto anticonvulsivo del EHE del rizoma de la *Valeriana edulis* se observó un incremento de la latencia al probar todas y cada una de las dosis, habiendo diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0.05$) al compararlas contra el grupo control (ver gráfica 7), el número de crisis, la duración disminuyó al comparar contra el grupo control (ver gráficas 8,9), lo mismo ocurrió en el caso de la letalidad (ver gráfica 10); lo anterior se le puede atribuir al efecto estimulante y depresor que presenta el alcohol según la dosis utilizada, por lo que el uso de este tipo de extractos dificultó la evaluación del efecto anticonvulsivo del rizoma de la *Valeriana edulis*.

Los dos tipos de extractos probados anteriormente coinciden con las recomendaciones para diversos tratamientos alternativos a base de productos naturales extraídos de plantas medicinales (104,105) en donde se usan infusiones, extractos y diversos preparados a partir de productos naturales de origen vegetal para el tratamiento de diversas afecciones del SNC con buenos resultados terapéuticos.

Durante la prueba de desplazamiento locomotriz se observaron manifestaciones de intoxicación debidas posiblemente a la solución hidroetanólica con la cual se preparo el EHE ya que los animales se arrinconaron y se mantuvieron inmóviles durante la prueba, lo anterior fue muy evidente en el grupo control, sin que este tipo de dificultades se presentarán con el EA, lo cual coincidió con diversos estudios etnobotánicos y farmacológicos en los cuales se utilizan diversos extractos de fitofármacos (33,103,118,160) y ya que el alcohol esta contraindicado en el tratamiento de la epilepsia se prefirió seguir trabajando experimentalmente con el EA.

De acuerdo a la revisión bibliográfica realizada en el presente proyecto, se pudo apreciar la existencia de una permanente preocupación por lograr tratar de manera adecuada un problema de salud pública tan importante como es la epilepsia tal y como se describe en diversos trabajos (4,5,6,7,8), además de que existe una creciente aceptación en lo que respecta al uso de productos herbolarios hoy en día, y que las autoridades sanitarias correspondientes se están dando a la tarea de establecer la

medidas reglamentarias pertinentes para la realización de dicha práctica herbolaria a nivel mundial (18,21,24).

Este hecho se aprecia en muy diferentes publicaciones que tratan de etnobotánica, herbolaria, naturismo etc. (14,15,19,94,100), a la presencia de foros especializados como el XIV Congreso Internacional de Medicina Tradicional y alternativas terapéuticas organizado por la Academia Mexicana de Medicina Tradicional A.C. en la UAM-Xochimilco en Noviembre del año 2000, con la participación de especialistas en medicina tradicional e investigadores de diferentes universidades, etc.

Existen amplios reportes en la literatura sobre la descripción y aplicación terapéutica de la *Valeriana officinalis* (18,97,98,160), mientras que para la *Valeriana edulis* existen escasos reportes a este respecto (14) de aquí la relevancia del presente proyecto, por ser uno de los primeros trabajos en que de manera científica y sistemática se están reportando los efectos terapéuticos (anticonvulsivos) de esta especie del mismo género, aunque no se ha estudiado lo suficiente hasta la fecha.

Para la realización del presente proyecto de investigación se eligió el modelo murino de convulsiones inducidas por PTZ debido a su fácil adquisición y manejo (70,123). Además de la adecuada respuesta convulsiva que se presenta en los ratones en dicho modelo experimental, lo cual está debidamente documentado y permitió probar el efecto anticonvulsivo de los diferentes extractos del rizoma de la *Valeriana edulis*.

El uso del EHE del rizoma de la *Valeriana edulis* se llevó a cabo para contrastar los preparados hidroalcohólicos existentes en el mercado (elixires y tinturas), se dificultó la evaluación del efecto anticonvulsivo debido a la disminución en la actividad que presentaron los ratones por efecto de la propia solución alcohólica al 70%, como se describe en algunos trabajos previos (18,112,137), así como en lo publicado en las normativas oficiales nacionales e internacionales.

Es muy importante que este tipo de ensayos se realicen bajo las mismas condiciones; es decir a la misma hora del día, grado y tipo de iluminación, nivel de ruido, etc., para minimizar el efecto circadiano (*circa diem* "alrededor del día") sobre los resultados experimentales como aparece en (139), ya que existen características y tendencias conductuales determinadas genéticamente (variación interindividual), cambios en la absorción, distribución, metabolismo y excreción de las sustancias, cambios en la sensibilidad del sitio de acción, etc. como describe (138).

Por lo tanto hay que tener cuidado de suprimir los periodos de habituación (cambios conductuales originados por algún tipo de estimulación), en los cuales hay una disminución de la respuesta, o sensibilización por estimulación repetida (manipulación) en el sujeto experimental, lo cual se puede deber a una conducta de aprendizaje por exposiciones previas.

Con respecto a la prueba para determinar la actividad toxicológica de los extractos con actividad anticonvulsiva por medio del modelo de la actividad locomotriz ambulatoria en el ratón, se apreció que ninguno de los extractos a las dosis probadas tiene un efecto tóxico letal, ya que ninguno de los animales murió durante la prueba, pero se presentó un efecto depresor del SNC debido al efecto de la solución hidroetanólica al 70%, lo mismo ocurrió con las diferentes dosis del EHE del rizoma de la *Valeriana edulis*, que se manifestó durante el período de acostumbramiento previo al conteo de los desplazamientos e incluso durante el desarrollo de la prueba; este mismo comportamiento llega a ocurrir al usar otros anticonvulsivos, lo cual coincide con los diversos trabajos de eficacia y seguridad en el uso de los extractos obtenidos a partir de productos naturales (102,121).

En el análisis cromatográfico, se apoyo en trabajos como (141) y de acuerdo a nuestro planteamiento se aprecia un mayor número de manchas en la placa de SiO₂ confirmándose así la presencia de sustancias bioactivas en el extracto estudiado y las cuales según el desplazamiento mostrado indican un comportamiento que va de medianamente polar a polar en el sistema propuesto, lo cual también coincide con los planteamientos hechos en (144).

Para realizar el fraccionamiento parcial, la metodología planteada se diseñó a partir de revisión química estructural de los diferentes fitoconstituyentes contenidos en la *Valeriana edulis* hecha en el Chemical abstract (103,106,107,160), se demostró que el mayor efecto anticonvulsivo se presentó al probar la fracción acuosa del EA ya que es en donde ya no hubo letalidad y tiene un adecuado perfil anticonvulsivo ya que incrementa la latencia a la primera crisis convulsiva con respecto al grupo control, así como una disminución en el número y la duración de estas crisis.

De acuerdo a todo lo descrito anteriormente se puede indicar que se alcanzaron de manera satisfactoria los objetivos planteados para el presente proyecto de investigación ya que se prepararon y probaron los diferentes extractos del rizoma de la *Valeriana edulis*, evaluándose satisfactoriamente su actividad anticonvulsiva, así como su actividad toxicológica sin que ninguno de los extractos probados experimentalmente presentan problemas de letalidad.

IX CONCLUSIONES

Se alcanzaron todos y cada uno de los objetivos:

Se obtuvieron los EA y EHE del rizoma de *Valeriana edulis ssp procera*.

Se determinó la curva de dosis efecto para el tratamiento anticonvulsivo en el modelo farmacológico preclínico planteado para el EA y EHE del rizoma de la *Valeriana edulis*.

Se observó el efecto anticonvulsivo con los extractos recién preparados (EA y EHE) del rizoma de la *Valeriana edulis*, siendo más sencillo de manejar el EA ya que solamente se trata de una infusión.

El efecto anticonvulsivo se presentó a partir de la dosis de 33 hasta 100 mg/Kg del extracto acuoso (EA) del rizoma de *Valeriana edulis* con respecto al grupo control; observándose que para dosis por debajo de 33 mg/Kg no se produce efecto.

Se observó un similar efecto protector contra las crisis convulsivas con todas las dosis del EHEf del rizoma de *Valeriana edulis*, encontrándose resultados menos importantes con la dosis de 100 mg/Kg con respecto al grupo control.

En la prueba de toxicidad: el análisis de los resultados permite establecer la mayor eficacia del EA en relación al EHEf, ya que en este último existe un menor desplazamiento con diferencias estadísticamente significativas en los ratones estudiados, sin que ninguno de ellos presente problemas de intoxicación (letalidad), tal como ocurre en los tratamientos con los fármacos anticonvulsivos de patente, que actúan como depresores del SNC.

En cuanto al ensayo de la actividad biológica del fraccionamiento parcial se considera que la fase acuosa presentó un mejor efecto anticonvulsivo en el modelo convulsivo de PTZ en ratones ya que disminuye la latencia para la primera crisis, el número de crisis y su duración, además de que su sobrevivencia fue del 100%.

Se estableció que la raíz de *Valeriana edulis ssp procera* presenta actividad anticonvulsiva en el modelo de convulsiones inducidas por el pentilentetrazol (PTZ) evaluados *in vivo* en el modelo para ratón.

Por lo tanto se puede concluir que el EA del rizoma de la *Valeriana edulis* tiene una adecuada perspectiva para ser usado como tratamiento alternativo en las crisis de ausencia, ya que experimentalmente muestra un adecuado perfil anticonvulsivo en el modelo planteado; se demostró la seguridad en su aplicación como tratamiento alternativo naturista, el cual se pudiera implementar en aquellos pacientes epilépticos que son resistentes a los tratamientos médicos convencionales, y de esta manera poder evitar que tengan que llegar a ser candidatos a cirugía.

Sin olvidar que se deben de completar los estudios pertinentes, para poder aplicar esta alternativa de tipo naturista para el tratamiento de estos pacientes.

X BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Rubio Donnadiou F. Conceptos de epilepsia. Archivos del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. 1988; 3: 121-127.
- 2.- Fisher R. S. Clinical overview of epilepsy. Neurotransmitters and epilepsy. Wiley – Liss publication. 1991; 1-16.
- 3.- Woermann F.G., Sisodiya S.M., Free S.L. and Duncan J.S. Quantitative MRI in patients with idiopathic generalized epilepsy. Evidence of widespread cerebral structure changes. Brain 1998; 121: 1661-1667.
- 4.- Saíz Díaz R. A. y Ángel Rein G. Continua Neurológica. Publicación de la Sociedad Española de Neurología. ¿Tiene el paciente una epilepsia parcial?. 2000; 3: 1-20.
- 5.- Rubio Donnadiou F. Manual de epilepsia. Elaborado por el Programa Prioritario de Epilepsia S.S. 1999; 1-15.
- 6.- Rubio Donnadiou F, García Pedroza F. Compendio de Epilepsia. Elaborado por el Programa Prioritario de Epilepsia. Fundación Ciba-Geigy contra la epilepsia. 1999; 1-142.
- 7.- Bialik Perel R, García Pedroza F.; Epilepsia. Aspectos neurobiológicos, médicos y sociales. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Primera edición 1997; 391-414.
- 8.- Placencia M. La epilepsia en Latinoamérica. Rev. Ecuat. Neurol. 1995; 113-114.
- 9.- De Deyn P., D'Hooge R., Marescau B. and Yin-Quan P. Chemical models of epilepsy with some reference to their applicability in the development of anticonvulsants. Epilepsy Research. 1992; 12: 87-110.
- 10.- Gilani AH, Aziz N, Khan MA, Shaheen F, Jabeen Q, Siddiqui BS, Herzig JW Ethnopharmacological evaluation of the anticonvulsant, sedative and antispasmodic activities of *Lavandula stoechas L.*
J Ethnopharmacol 2000; 71(1-2):161-7
- 11.- Bruneton J. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. Editorial Acriba. 1991; 277-279.
- 12.- Fisher R. S. Animal models of the epilepsies. Brain Research Reviews 1989; 14: 245-278.
- 13.- Noback R. C., Demarest J. R. Neurofisiología Básica. Sistema Nervioso Humano. Mc Graw-Hill 1980; 63-86.
- 14.- Castillo España P. Cultivo *in vitro* de *Valeriana edulis ssp. procera* (HBK) Meyer (Valerianaceae): Una especie medicinal sobre explotada. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología). Facultad de Ciencias. U.N.A.M. 1993.

- 15.- Azuela L. F. El Instituto Médico Nacional como espacio de legitimación de la medicina mexicana tradicional. *Las Ciencias Químicas y Biológicas en formación en un mundo*. Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco. 1995; 359-371.
- 16.- Aceves P. Hacia la Farmacia Nacional: La primera Farmacopea del México Independiente. *Farmacia, Historia Natural y Química Internacionales*. Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco. 1996; 161-177.
- 17.- Viesca C. Ticiotl. Conceptos médicos de los antiguos mexicanos. Serie monográfica de historia y filosofía de la medicina. U.N.A.M. 1997; 7-88.
- 18.- Bombardelli E, Morazzoni P. *Valeriana officinalis L (Valeriana sylvestris Blak. Dod)* Idena Spa. Scientific Departament 1994; 1-26.
- 19.- Sánchez S. O. La flora del Valle de México Editorial Herrero S.A. 1984; 383-384.
- 20.- Hansel R y Trunzler G. Información básica sobre los fitofármacos. *Farmasa Schuave*. 1999; 5.
- 21.- Estrada L. E. Plantas medicinales de México, Introducción a su estudio. Universidad Autónoma de Chapingo. Unidad de estudios etnobotánicos. 1992; 3-28, 49-62.
- 22.- Heinze G y Ontiveros M. La fitofarmacología como tratamiento alternativo en psiquiatría. *Salud Mental*. 1998, 21; 6: 33-42.
- 23.- Albrech M, Berger W, Laux P, Schmidt U, Cornel M. Los psicofármacos y la seguridad al conducir. *Farmasa Schwabe*. 1999; 1-8.
- 24.- Álvarez L, García M. R., Garzón S. Ma. de L. Medicamentos naturistas en México. Cuadernos CBS. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco División de Ciencias Biológicas y de la Salud. 1991; 2-14.
- 25.- Atlas de medicina naturista y alternativas, terapias y consejos para la salud. *Cultural S.A.* 1997; 5.
- 26.- Hansel R. Posibilidades y limitaciones de los fitofármacos. (Fitoterapia). *Deutsche Apothekerzeitung*. 1987; 127: 2.
- 27.- Lozoya X. Gómez E. Fitofármacos. Simposio IMSS Farmasa/Schwabe 1. 1997; México.
- 28.- Kasture V.S., Chopde C.T., Deshmukh V.K. Anticonvulsive activity of *Albizia lebeck*, *Hibiscus rosa sinesis* and *Butea monosperma* in experimental animals. *J. Ethnopharmacol* 2000; 71(1-2): 65-75.

- 29.- Haruna A.K. Depressant and anticonvulsant properties of the root decoction of *Afrormosia laxiflora* (Leguminosae). *Phytother Res* 2000; 14(1):57-59.
- 30.- Hsieh C.L., Tang N.Y., Chiang S.Y., Hsieh C.T., and Lin J.G. Anticonvulsive and free radical scavenging actions of two herbs, *Uncaria rhynchophylla* (MIQ) Jack and *Gastrodia elata* Bl., in kainic acid-treated rats. *Life Sci* 1999; 65(20): 2071-2082.
- 31.- Ortiz J. G., Nieves-Natal J., Chávez P. Effects of *Valeriana officinalis* extracts on [3H]flunitrazepam binding, synaptosomal [3H]GABA uptake, and hippocampal [3H]GABA release. *Neurochem Res* 1999; 24(11): 1373-1378.
- 32.- Bastidas Ramírez B. E., Navarro Ruíz N., Quezada Arellano J. D., Ruíz Madrigal B., Villanueva Michel M.T., Garzón P. Anticonvulsant effects of *Magnolia grandiflora* L. in the rat. *J Ethnopharmacol* 1998; 61(2): 143-152.
- 33.- Santos F. A., Rao V. S., Silveira E R. The leaf essential oil of *Psidium guyanensis* offers protection against pentylentetrazole-induced seizures. *Planta Med* 1997; 63(2): 133-135.
- 34.- Lewis W. H. Reporting adverse reactions to herbal ingestants. *JAMA*. 1978; 240: 109-110.
- 35.- Spoeke D. G. Herbal medication: use and misuse. *Hosp Form*. 1980; 15: 941-951.
- 36.- Rodríguez L. I., Pérez G. J.C., Epilepsia definición. Compendio de Epilepsia. Elaborado por el Programa Prioritario de Epilepsia. Fundación Ciba-Geigy contra la epilepsia. 1999; 3.
- 37.- Rubio Donnadiou F. Aspectos generales y clasificación de la epilepsia. Epilepsia aspectos neurobiológicos, médicos y sociales. Programa prioritario de epilepsia Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Secretaría de Salud. 1997; 1-6.
- 38.- Chusid G. J. Epilepsia. Neuroanatomía correlativa y neurología funcional. Ed. Manual Moderno. 1977; 422-431.
- 39.- Weisbecker K. Durner M, Janz et al. Information of linkage between juvenile myoclonic epilepsy locus and the HLA region chromosome 6. *Am. J. Med. Genet* 1991; 38: 32-36.
- 40.- Van Rijn C. M., Willems-Van Bree E., Dirksen R. and Rodríguez de Miranda J. F. The GABA_A receptor complex in relation to epilepsy. Reversal of [³H] TBOB inhibition: a prediction of proconvulsive properties?. *Epilepsy Research*. 1992; 12: 163-170.

- 41.- Meinardi H. Aspects of pharmacotherapy in epilepsy. *Epilepsy Research*. 1992; 171-177.
- 42.- Cooper J. R., Bloom F.E., Roth R. H. Las Bases Bioquímicas de la Neurofarmacología. Ed. Manual Moderno. 1984; 206-226.
- 43.- Querol N., F. Jarauta S., Ibáñez I. A., Cisneros L. T., Rando A. E. Hiperhidrólisis unilateral paroxística. *Neurología Publicación Oficial de la Sociedad Española de Neurología*. 1994; 9, (9): 419-421.
- 44.- Iudice A. and Murri L. Pharmacological prophylaxis of post-traumatic epilepsy. *Drugs* 2000; 59 (5): 1091-1099.
- 45.- Aminoff J.M., Greenberg A. D., Simon P. R. *Neurología Clínica*. Manual Moderno. 1998; 284,285.
- 46.- Romero C. R. *Teniasis*. Manual de terapéutica médica. Editorial Trillas. 1991; 121-122.
- 47.- Velasco F. A., Martínez de Muños D., Rubio Donnadieu F. *Epilepsia un enfoque multidisciplinario*. Editorial Trillas. 1986.
- 48.- Shiff N. D., Labar R. D., Victor D. J. Common dynamics in temporal lobe seizures and absence seizures. *Neuroscience*. 1999; 91, 417-428.
49. Noboa C. A. Epilepsia y electroencefalografía: ¿pseudoverdades o verdades? *Rev. Ecuat. Neurol*. 1995; 4; 1-3.
- 50.- Garza Morales S, Ibarra Puig J. y Alva Moncayo E. Epilepsia y embarazo. *Compendio de epilepsia*. Programa prioritario de epilepsia S.S.A. 1997; 69-71.
- 51.- Jick S. S., Terris Z. B. Anticonvulsants and congenital malformations. *Obstetrical and gynecological survery*. 1998; 53, (1-3): 4 -5.
- 52.- Moreno Altamirano A., López-Moreno S., Corrido-Berdugo A. *Salud Pública en México*. Principales medidas epidemiológicas. 2000; 337-348.
- 53.- Eadie M.J., Tyrer J.H. *Anticonvulsant therapy: Pharmacological basis and practice*. Churchill Livingstone. N.Y. 3a. ed. cap. IV. 1989; 29-37.
- 54.- Galindo M. J. A. Últimos hallazgos en el tratamiento de la epilepsia. *Diccionario de especialidades Sistema Nervioso Central*. Ediciones PLM. 2000; 113-205.
- 55.- Ewart A. S., Woodhead H. J., White H. S. and Franklin R. M. *General principles. Experimental selection, quantification, and evaluation of anticonvulsants. Antiepileptic drugs, third edition*, Raven Press. N.Y. 1989; 85-102.
- 56.- Chan W. K. A., *Fármacos utilizados en el tratamiento de la epilepsia*. Farmacología Smith/Reynard. Editorial Médica Panamericana. 1997; 320-336.

- 57.- Gross R. A. A brief history of epilepsy and its therapy in the western hemisphere. *Epilepsy Res.* 1992; 12: 65-74.
- 58.- Miller A. A., Wheatley P., Sawyer D., Baxter M, Roth B. Pharmacological studies on lamotrigine a novel potential antiepileptic drug. I. Anticonvulsant profile in mice and rats. *Epilepsia* 1986; 27: 483-489.
- 59.- Goa K. L., Ross S. R., Chrisp P. Lamotrigine. A review of its pharmacological properties and clinical efficacy in epilepsy. *Drugs* 1993; 46: 15-176.
- 60.- Herranz J. L., Arteaga R. y Armijo J. A. Nuevos antiepilépticos: vigabatrina, lamotrigina, felbamato. *Neurología Publicación Oficial de la Sociedad Española de Neurología.* 1994; 9, (9): 410-417.
- 61.- Urquiza, G. Para acallar los gritos de las neuronas. (Investigación experimental en epilepsia). *Ciencia y tecnología. Información científica y tecnológica.* Febrero 1989; 11, (149): 35.
- 62.- Sabers A. and Gram L. New anticonvulsants comparative review of drugs interactions and adverse effects. *Drugs.* 2000; 60, (1): 23-33.
- 63.- Gamundi M.C., Caraceller M. A., Caromina N., Mantener P., Torre I. *Ginecología y obstetricia Farmacia hospitalaria (Glaxo).* Editorial Médica Interamericana. 1992; 1068.
- 64.- Brater C. Johnson R. A. Wesley G. C. *GOTH Farmacología clínica.* 12va edición. Ed. Médica Panamericana. 1991; 24-27, 257, 315-316, 606, 617.
- 65.- Clarke. E.G.C. Isolation and identification of drugs. In *pharmaceuticals, body fluids and post-mortem material.* The Pharmaceutical Press. 1974; 496.
- 66.- Katzung G. B. *Farmacología básica y clínica.* 5ta Edición en Español Editorial Manual Moderno México 1994; 423-434.
- 67.- Medimecum. *Guía de la terapia farmacológica . Fenitoína (Difenilhidantoína).* Epigrafos S.A. Madrid. 1998; 472.
- 68.- Philip J., Holcomb I. J., Fusari S. A. *Analytical profiles of drug substances. Phenytoin.* 1984; 417-441.
- 69.- *Vademecum Farmacéutico. Hidantoina.* 2000; 1156-1157.
- 70.- Fisher R. S. *Approach to drug therapy for epilepsy. BNI QUALTERLY.* 1999; 15. No.1: 10-19.

- 71.- Rivas Vilchis J.F. Martínez M. A. Manual de interacciones medicamentosas adversas. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. 1983; 149-153.
- 72.- Bittencourt P. R. M., Antoniuk S. A., Bigarella M. M., Da Costa J. C., Doro M. P., Ferreira A. S., Fonseca L. C. Gorz A. M., Goncalves e Silva G. E., Marcourakis T., Tedros G. M. A. S. Carbamazepine an phenytoin in epilepsies refractory to barbiturates: efficacy, toxicity and mental function. *Epilepsy Research* 1993; 16: 147-155.
- 73.- Smith C. Reynard A. *Farmacología*. Ed. Médica Panamericana. 1992; 27-39,323-515.
- 74.- Goodman Louis S., Gilman Alfred. *Bases farmacológicas de la terapéutica*. 5ta edición. Interamericana. 1978; 305, 306.
- 75.- Calva Mercado J. J. *Salud Pública de México. Estudios clínicos experimentales*. 2000; 349-358.
- 76.- Hill D. R. and Bowery N. G. 3 H-baclofen and 3 H-GABA bind to bicuculline insensitive GABA_B sites in rat brain. *Nature* 1981; 290: 149-154.
- 77.-Whittaker J. O. Whittaker S. J. *Psicología*, 4ta edición McGraw Hill, México 1989; 84.
- 78.- Heinze G., Ontiveros M. La fitofarmacología como tratamiento alternativo en psiquiatría. *Salud Mental* 1998; 21; 6: 33-42.
- 79.- Wláz P. Loscher W. The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsivant drugs. V. Lack of seasonal influences on amygdala kindling in rats. *Epilepsy Research*. 1993; 16: 131-136.
- 80.- Aird, R, Masland, R. Woodbury, D.M. *The Epilepsies: A Critical Review*. Raven Press. New York 1984.
- 81.- Crossland, J. *Lewis's Farmacology*. Fifth edition, Churchill Livingstone, New York 1980.
- 82.- López Naranjo F. La serotonina en el hipocampo y su forma de participación en las crisis convulsivas por el ácido kaínico en la rata. Tesis de licenciatura, Q.F.B. Facultad de Química, U.N.A.M. 1989.
- 83.- Chamorro C. G. Estudios de toxicología preclínica para nuevos fármacos. *Arch. Neurocién. (Méx)*. 1996; 1. No 2: 118-121.
- 84.- Schander M., Thomalske G., Frotscher M. Fine structure of GABAergic neurons and synapses in the human dentate gyrus. *Brain Research*. 1987; 401: 185-189.
- 85.- Mehler F. M., Kessler J. A. Progenitor cell biology Implications of neural regeneration. *Archives of Neurology*. 1999; 56: 780-784.

- 86.- Uwe R., Crestani F., Benke D. Brining I., Benson J. A., Martin J. R. Benzodiazepine actions mediated by specific γ -aminobutyric acid_A receptor subtypes. *Nature*. 1999; 400: 796-800.
- 87.- Peinado M. J., Martínez-Martos J. M., Afaílal I., Iribar M. C. Canales de calcio y mecanismos de liberación de neurotransmisores en el Sistema Nervioso Central. *Folia Neuropsiquiátrica* 1996; 31: 123-139.
- 88.- Dreiffus F. Classification of seizures. In: comprehensive epileptology. Raven Press. 1991; 77-86.
- 89.- Less J.G. Pharmacology of AMPA/kainite receptor ligands and their therapeutic potential in neurological and psychiatric disorders. *Drugs*. 2000; 59 (1): 33-78.
- 90.- The Encyclopedia of Molecular Biology. Blackwell Science 1995; 357.
- 91.- Pitkanen M. Silvio J. Ylien A, Koivisto E. Riekkinen P. Effects of NMDA receptor modulation on hippocampus. *Gen. Pharmacol.* 1995; 26: 1065-1070.
- 92.- Rodríguez-Martínez E., Camacho A., Maldonado D. P., Pedraza-Chaverrí J., Santamaría D., Galván-Arzate S., Santamaría A. Effect of quinolinic acid on endogenous antioxidants in rat hábeas striatum. *Brain Research*. 2000; 858:436-439.
- 93.- Manjarrez M. J. Efecto de las microinyecciones de AP-7 en la formación reticular pontina de la rata, sobre las crisis epilépticas provocadas por el pentilentetrazol. Tesis de licenciatura. Biólogo. Facultad de Ciencias. U.N.A.M. 1997.
- 94.- Kravzov J. J., Altagracia M. M., Díaz P. C. Efectos adversos de las plantas medicinales. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 2000, 31, (3):17-22.
- 95.- WHO. Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines. World Health Organization, Regional Office for the Western Pacific. Manila. 1993; 1-115.
- 96.- Legislación Sanitaria Mexicana. 4ta edición, Ediciones Delma, Febrero de 1997.
- 97.- Treace G. E.; Evans W. C. Tratado de Farmacognosia. 12va edición, Interamericana. 1987; 539-542.
- 98.- Rosecrans J. A. Defeo J. J. and Yoingken H. W. Pharmacological investigation of certain *Valeriana officinalis* L. extracts. *Journal Pharmaceutical Sciences*. March 1961, (50): N°3, 240-244.
- 99.- Fitoterapia. Vademecum de la prescripción.
- 100.- Martínez M. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica. 1994; 955.
- 101.- Guía práctica de flores y plantas. Euroliber. 1992, (8): 219.

- 102.- Leathwood P. D., and Chauffard F. Aqueous extract of valerian reduces latency to fall asleep in man. *Planta Med.* 1985; 51:144-148
- 103.- Hendriks H. Bos R.; Allersma, Th. Malingre M. and Kosler Sj. Pharmacological screening of valerianol and some other components of essential oil of *Valeriana officinalis*. *Journal of Medicinal Plant Research (Planta Médica)* 1981, 42. 62-68.
- 104.- Castleman M. Hierbas curativas. Editorial Diana. 1994, 475-479, 507.
- 105.- Cáceres A. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Editorial Universitaria (Universidad de San Carlos de Guatemala). 1996, 365.
- 106.- Bounthanh D., Missilin R., Anton R. Biologically Active Natural Products. Active comparee des preparations galeniques de valeriane, *Valeriana officinalis*, sur le comportement de la souris. *Planta Médica.* 1980; 241-242.
- 107.-Denee R., Bos R., Hazelhoff B. Isolation and structure elucidation of isovaltral, a decomposition product of isovaitrate. *Journal of Medical Plant Research.* 1979; 45-48.
- 108.- Porsolt R. D.; Le Pichon M.; Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature.* 1977; 266: 730-732
- 109.- Gessner G Hawley. Diccionario de Química y Productos Químicos. Ediciones Omega. 1985, 870-871.
- 110.- Legislación sanitaria. Programa contra el alcoholismo y abuso de bebidas alcohólicas (NOM/076SSA). Ediciones Delma. 1997, 69.
- 111.- Driesbach H. R. Manual de Toxicología Clínica. Ed. Manual Moderno. 5ta edición. 1984; 155-159, 177.
- 112.- Gauvin D. V. and Briscoe R. J., Baird T. J., Vallett M., Carl K. L and Holloway F. A. Cumulative vs acute dose- response procedures produce differential BAC and behavioral functions for ethanol. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 1997; 397- 403.
- 113.- Atlas de la Medicina Naturista y alternativas. terapias y consejos para la salud. Cultural S. A. 1997; 12-14, 60-64, 84-88.
- 114.- Astin A. J. Why patients use alternative medicine. *JAMA.* 1998; 279:1548-1553.
- 115.- Sonnen E. H. A. Alternative and folk Remedies. *Epilepsy: A Comprehensive textbook.* 1997; 1365-1378.
- 116.- Aldama L. S. Experiencia y reflexión de un año en un hospital holístico. XIV Congreso Internacional de Medicina Tradicional y Alternativas Terapéuticas. Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco. 2000; 122.
- 117.- Licea de Arenas J., Valles J., Arenas-Licea R. El lado científico de la medicina alternativa y la complementaria. XIV Congreso Internacional de Medicina Tradicional

- y Alternativas Terapéuticas. Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco. 2000; 112.
- 118.- Garzón-De la Mora P, García-López P. M. García-Estrada J. Navarro-Ruiz A. Villanueva-Michel T. Villarreal-de Puga L. M. Casillas-Ochoa J. *Casimora edulis* seed extracts show anticonvulsive properties in rats. *J. Ethnopharmacol.* Dec. 1999, 275-282.
- 119.- Gränicher F, Christen P, Kapetanidis I. High-yield of valepotriates by hairy root cultures of *Valeriana officinalis* L. var. *sambucifolia* Mikan. *Plant Cell Report.* 1992; 11: 339-342.
- 120.- Katz R. The role of the FDA. *Epilepsy: A Comprehensive Textbook.* Lippincott-Raven Publishers. 1997; 1445-1448.
- 121.- Moore J. T., Psaty M. B., Furberg D. C. Time to act on drug safety. *JAMA.* 1998; 279:1571-1573.
- 122.- De Deyn P. P., McDonald R. L. Effect antiepileptic drugs on GABA responses and on reduction of GABA responses by PTZ and DMCM on mouse neurons in cell culture. *Epilepsia.* 1989; 30: 318-328.
- 123.- Ewart A. Swinyard, William C. Brown and Louis S. Goodman. Comparative assay of antiepileptics drugs in mice and rats. *J.of Pharmacol. Exp. Ther.* 1952, 106, 319-330.
- 124.- Gernet M, Richter A, Löscher W., Subconvulsive dose of pentylenetetrazole increase the firing rate of substantia nigra pars reticulata neurons in dystonic but not in nondystonic hamsters. *Synapse.* 1999; 33. No.4: 259-267.
- 125.- Domer R. Floyd. *Animal Experiments in Pharmacological Analysis.* Charles C. Thomas Publishe. 1971; 16, 21, 312, 332, 336, 341-346, 428-430, 458.
- 126.- Ekonomou A, Angelatou F., Uperregulation of NMDA receptors in hippocampus and cortex in the pentylenetetrazol-induced "kindling" model of epilepsy. *Neurochem. Res.* 1999; 24. No.12: 1515-1522.
- 127.- Ruthrich H, Grecksch G, Krug M., Effects of piracetam on pentylenetetrazol-kindling development, hippocampal potentiation phenomena and kindling-induced learning deficit. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1999; 360. No.4: 413-420.
- 128.- Wang L., Ono J., Walson P. D. Development of pentylenetetrazol kindling model. *Yao Hsueh Pao.* 1993; 7: 486-489.
- 129.- Walton Y. N., Treiman M. D. Valproic acid treatment of experimental status epilepticus. *Epilepsy Research.* 1992; 12: 199-205.
- 130.- Fueta Y., Avoli M. Effects of antiepileptic drugs on 4-aminopyridine-induced epileptiform activity in young and adult rat hippocampus. *Epilepsy Research.* 1992; 12: 207-215.

- 131.- Pakes, S. Guide for the care and use of laboratory animals. U. S. Department of health and humane service. National Institute of Health. USA 1985.
- 132.- Clough, G. Laboratory animal housing. Alanan Consultanci Services. England 1979.
- 133.- Simmons, M.L. The laboratory mouse. Prentice Hall Inc. USA 1970.
- 134.- Roswell, Harry. Cuadro básico de los animales experimentales . Welfare Institute 1967.
- 135.- Chan, P.K., O'Hara, G.P. Principles and methods of acute and subchronic toxicity. In: Principles and methods of Toxicology. Hayes W . Ed, Raven Press, New York. 1982.
- 136.- Martínez M. Las plantas medicinales de México. Ediciones Botas. 1969, 337-339.
- 137.- Hiller K.O. and Zetler G. Neuropharmacological studies on ethanol extracts of *Valeriana officinalis* L.: Behavioural and anticonvulsant properties. Phytotherapy Research. 1996; 10: 145-151.
- 138.- Thompson, R. F. Introducción a la psicología fisiológica. Ed. Harla. 1997; 490.
- 139.- Nelson W. Kupferberg H. and Halberg F. Dose-response evaluations o circadian rhythmic change in susceptibility of mice to Ouabain. Toxicology and Applied Pharmacology. 1971; 335-339.
- 140.- Enciclopedia de la tecnología farmacéutica . Editorial Omega. 1985; 1,5,7.
- 141.- Bariska J., Csermely T., Furst S., Lalász H., Barhori M. Journal Liquid Chromatography and Relation Technological. Displacement thin-layer chromatography. 2000; 531-549.
- 142.- Bernard F. Sherma J. Thin-Layer Chromatography techniques and applications. Chromatographic Science Series, second edition, Marcel Dekker. INC. New York. 1986; 35: 213-222.
- 143.- John A. Adamovics. Chromatographic analysis of Pharmaceuticals. Chromatographic Science Series. Marcel Dekker. INC. New York. 1990; 49: 85-106.
- 144.- Dumont E. JorK H. Kraus Lj. Rozumek K. E. Schorn P. J. and Stalh E. Bariska J., Csermely T., Furst S., Lalász H., Barhori M
Drug analysis chromatography and microscopy. Ann Arbor Science Publisher INC. 1973; 191-194, 221.
- 145.- Florey K. Analytical profiles of drug substances. Academic Press New York. 1979; 18: 529-556.

- 146.- Navarro Fierro R. Introducción a la Bioestadística. Mc Graw Hill 1988; 19, 53, 79, 80.
- 147.- Dawson-Saunders B. Trapp G. R. Bioestadística médica. Manual moderno 2da edición 1997; 160.
- 148.- Materia de Investigación para la Salud. Capítulo II, art. 65 – 68. Legislación Sanitaria, 4ta edición. Ediciones Delma. 1997; 825, 826.
- 149.- Strasburger E., Noll F., Schenck H., Geobotánica en: Tratado de botánica. Ediciones Omega. 1985; 915.
- 150.- Diccionario Enciclopédico de Ciencias Médicas. Mc Graw-Hill. 1985; 565,595.
- 151.- Loewenfeld C., Back Ph. Guía de hierbas y especias. Ediciones Omega. 1978; 477.
- 152.- Fisher R. S. Glutamate and epilepsy. Epilepsy A Comprehensive Textbook. Lippincott-Raven Publishers. 1997; (2): 131-145.
- 153.- Hernández M. L. R. Biología molecular integral. Limusa. 1979; 71,189,194,236,248.
- 154.- Feria V. A., Martínez de Muñoz D., Rubio Donnadiou F. Epilepsia aspectos neurobiológicos, médicos y sociales. INNN depto. de publicaciones científicas y Programa universitario de investigación en salud U.N.A.M. 1997; 1-24.
- 155.- Correa D., Sarti E., Tapia-Romero R., Rico R., Alcántara-Anguiano I., Salgado A., Valdez L. and Flisser A. Antigens and antibodies in sera from human cases of epilepsy or taeniasis from an area of México where *Taenia solium* cysticercosis is endemic. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 1999; (93): 69-74.
- 156.- Hauser W. A. The epidemiology of epilepsy. In advances in neurology. Raven Press N.Y. 1978; 313-359.
- 157.- Briskin D. P. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. Plant Physiology. 2000; 124: 507-514.
- 158.- Tikhonov D. B., Samoilova M. V., Buldakova S. L., Gmiro V. E. and Magazanik L. G. Voltage-dependent block of native AMPA receptor channels by dicationic compounds. British Journal of Pharmacology. 2000; 129 (2): 265-282.
- 159.- Bicnir B., Eghbali M., Everitt A. B., Gage P. W. Bicuculline, pentobarbital and diazepam modulate spontaneous GABA_A channel in rat hippocampal neurons. British Journal of Pharmacology. 2000; 131 (4): 695-710.

160.- Bos R., Woerdenbag H. J., van Putten F. M. S., Hendriks H., Scheffer J. C. J. Seasonal Variation of the essential oil, valerenic acid and derivatives, and valepotriates in *Valeriana officinalis* roots and rhizomes, and the selection of plants suitable for phytomedicines. *Planta Medica*. 1998; 64: 143-147.

161.- During J. M., Symes Ch. W., Lawlor P. A., Liu J., Dunning J., Fitzsimons H. L., Poulsen D., Leone P., Xu R., Dicker D. L., Lipski J., Young D. An oral vaccine against NMDAR1 with efficacy in experimental stroke and epilepsy. *Science*. 2000; 287: 1453-1460.

162.- Sander J. W. A. S. and Siilapää M. Natural history and prognosis. In Engel J. Jr., Pedley T. A. (Eds.) *Epilepsy A Comprehensive textbook*, Lippincott Raven Philadelphia, N.Y. 1997; 7, 69-86.

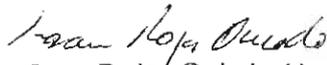
Comité TUTORIAL



Vo.Bo. Dr Luis Camilo Ríos Castañeda (Tutor).

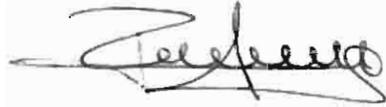


Vo.Bo. M. en C. Teresa Izquierdo Sánchez (Asesora).



Vo.Bo. Dra. Irma Rojas Oviedo (Asesora).

Comité EVALUADOR EXTERNO

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Reyes Haro Valencia', written over a light gray rectangular background.

Vo. Bo. Dr. Reyes Haro Valencia.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Joaquín Manjarrez Marmolejo', written over a light gray rectangular background.

Vo. Bo. Dr. Joaquín Manjarrez Marmolejo.